

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202090049 (13) A1

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2020.04.15(51) Int. Cl. A61K 39/12 (2006.01)  
A61P 31/18 (2006.01)  
C07K 14/16 (2006.01)(22) Дата подачи заявки  
2018.06.14

## (54) ПОКСВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ, КОДИРУЮЩИЕ АНТИГЕНЫ ВИЧ, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/520,079

(72) Изобретатель:

(32) 2017.06.15

Вегманн Франк, Лангедейк Йоханнес

(33) US

Петрус Мария, Кюстерс Йером

(86) PCT/IB2018/054386

Хюбертина Хенрикус Виктор, Бокстал

(87) WO 2018/229711 2018.12.20

Вики (NL), Калла Маркус (DE)

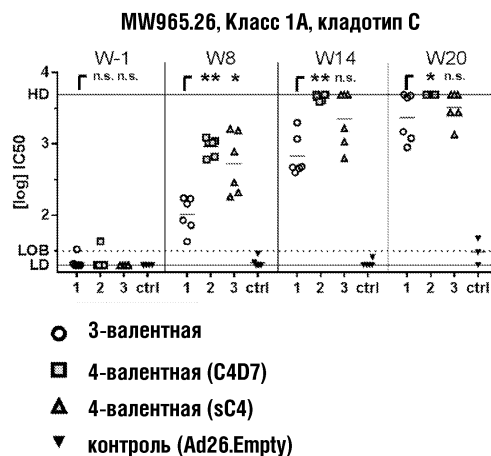
(71) Заявитель:

(74) Представитель:

ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД  
ПРЕВЕНШН Б.В. (NL); БАВАРИАН  
НОРДИК А/С (DK)

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к поксвирусным векторам, кодирующим синтетический антиген оболочки ВИЧ и другие антигены ВИЧ, а также композициям, содержащим такие поксвирусные векторы, и к применению таких поксвирусных векторов в качестве вакцин для повышения иммунитета против ВИЧ. Также изобретение относится к вакцинным комбинациям, содержащим раскрытые поксвирусные векторы, аденовирусные векторы, кодирующие один или более антигенов ВИЧ, и один или более выделенных антигенных полипептидов ВИЧ, и способам применения вакцинных комбинаций для повышения иммунитета против ВИЧ.



A1

202090049

202090049

A1

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-560483EA/025

### ПОКСВИРУСНЫЕ ВЕКТОРЫ, КОДИРУЮЩИЕ АНТИГЕНЫ ВИЧ, И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

#### Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет временной заявки на патент No. 62/520079, поданной 15 июня 2017, раскрытие которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме в соответствии со статьей 35 § 119(e) Кодекса законов США.

#### Ссылка на список последовательностей, поданный в электронной форме

[0001] Настоящая заявка содержит список последовательностей, который представлен в электронной форме посредством EFS-Web в формате ASCII для списка последовательностей в виде файла под названием «688097-331WO Sequence Listing», созданного 7 июня, 2017 и имеющего размер 174,4 килобайт. Этот список последовательностей, представленный посредством EFS-Web, является частью настоящей заявки и включен в настоящее описание в полном объеме посредством ссылки.

#### Предпосылки к созданию изобретения

[0002] Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) поражает миллионы людей во всем мире, и профилактика ВИЧ с помощью эффективной вакцины является в высокой степени приоритетной даже в эпоху широко применяемой антиретровирусной терапии. ВИЧ-1 является наиболее распространенным и патогенным штаммом вируса, причем более 90% случаев ВИЧ/СПИД'а связаны с заражением ВИЧ-1 группы М. Группа М также подразделяется на кладотипы или подтипы. В идеальном случае, эффективная вакцина была бы способна вырабатывать как мощные клеточные ответы, так и нейтрализующие антитела широкого ряда, способные нейтрализовать штаммы ВИЧ-1 различных кладотипов.

[0003] Высокая генетическая изменчивость ВИЧ-1 создает беспрецедентные проблемы при разработке вакцины против ВИЧ-1. Для расширения охвата потенциальных Т-клеточных эпитопов и улучшения клеточных ответов, другими учеными были описаны «мозаичные» антигены Gag, Pol и Env ВИЧ-1, происходящие от белков антигена (Gag), полимеразы (Pol) и оболочки (Env) группы ВИЧ, и была предпринята попытка обеспечить максимальный охват потенциальных Т-клеточных эпитопов (см., например, Barouch et al., Nat. Med 2010, 16: 319-323). По длине и структуре доменов, мозаичные антигены сходны с природными антигенами ВИЧ-1 дикого типа.

[0004] Так, например, мозаичными антигенами ВИЧ, описанными и используемыми в вакцинах, являются антигены, описанные Barouch et al., см., выше и в WO 2010/059732, такие как:

(a) мозаичные антигены Gag, включающие:

(a)(i) первую последовательность мозаичного Gag («mos1Gag»), имеющего аминокислотную последовательность, представленную здесь в SEQ ID NO: 1, и

(a)(ii) вторую последовательность мозаичного Gag («mos2Gag»), имеющего аминокислотную последовательность, представленную здесь в SEQ ID NO: 2;

(b) мозаичные антигены Pol, включающие:

(b)(i) первую последовательность мозаичного Pol («mos1Pol»), имеющего аминокислотную последовательность, представленную здесь в SEQ ID NO: 3, и

(b)(ii) вторую последовательность мозаичного Pol («mos2Pol»), имеющего аминокислотную последовательность, представленную здесь в SEQ ID NO: 4; и

(c) мозаичные антигены Env, включающие:

(c)(i) первую последовательность мозаичного Env («mos1Env»), имеющего аминокислотную последовательность, представленную здесь в SEQ ID NO: 5, и

(c)(ii) вторую последовательность мозаичного Env («mos2Env»), имеющего аминокислотную последовательность, представленную здесь в SEQ ID NO: 6.

[0005] Последовательности, кодирующие эти антигены, были клонированы в векторах, например, таких как рекомбинантные аденовирусные векторы, например, рекомбинантный аденовирус серотипа 26 (rAd26), и эти рекомбинантные векторы были ранее использованы в качестве вакцин для выработки иммунных ответов на антигены (см., например, Barouch et al., см. выше; и WO 2010/059732). Так, например, последовательности мозаичного антигена mos1Gag и mos1Pol обычно объединяют в гибридный белок Gag и Pol («mos1GagPol»), кодирующую последовательность которого клонируют в первый вектор Ad26 («rAd26.mos1GagPol»), а последовательности антигена mos2Gag и mos2Pol объединяют в другой гибридный белок Gag и Pol («mos2GagPol»), кодирующую последовательность которого клонируют во второй вектор Ad26 («rAd26.mos2GagPol»). Конструкции, кодирующие mos1Env и mos2Env, обычно клонируют в отдельные векторы Ad26 («rAd26.mos1Env» и «rAd26.mos2Env», соответственно).

[0006] Набор таких мозаичных антигенов, описанных выше, обеспечивает хороший полный охват изолятов ВИЧ-1 группы M, где векторы rAd26, кодирующие последовательности мозаичного антигена 1 (например, rAd26.mos1GagPol и rAd26.mos1Env), относятся преимущественно к кладотипу B и к подтипам CRF01 ВИЧ-1, а векторы rAd26, кодирующие последовательности мозаичного антигена 2 (например, rAd26.mos2GagPol и rAd26.mos2Env), относятся преимущественно к штаммам кладотипа C. Мозаичные антигены Gag, Pol и Env ВИЧ-1, экспрессируемые в векторах rAd26, могут быть использованы для увеличения как широты, так и глубины антиген-специфических ответов Т-лимфоцитов у макаков-резусов без какого-либо негативного влияния на клеточные и гуморальные ответы по сравнению с консенсусными или природными последовательностями антигенов ВИЧ-1 (Barouch et al., см., выше; и WO 2010/059732).

[0007] Однако после дальнейших попыток по разработке компонентов вакцины, описанных выше, было установлено, что rAd26.mos2Env обнаруживал неоптимальную экспрессию на клеточной поверхности и давал иммунный ответ у приматов, не являющихся человеком, и, кроме того, продемонстрировал до сих пор неизвестную,

неожиданную и непредсказуемую неоптимальную генетическую стабильность в процессе приготовления по сравнению с другими векторами rAd26, такими как rAd26.mos1Env. Таким образом, вакцины, содержащие rAd26.mos2Env, могут давать неоптимальные иммунные ответы против подтипов ВИЧ-1 кладотипа С, поскольку мозаичный антиген mos2Env предпочитает штаммы ВИЧ-1 кладотипа С. В соответствии с этим, существует потребность в создании альтернативы антигену mos2Env в вакцинах против ВИЧ, которые могут быть использованы для индукции усиленных иммунных ответов против ВИЧ-1 кладотипа С.

[0008] Поксвирусные векторы, такие как модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA), могут быть использованы для кодирования представляющих интерес антигенов в целях вакцинации. В настоящее время необходимо получить поксвирусные векторы, кодирующие новые комбинации антигенов ВИЧ.

#### **Краткое описание сущности изобретения**

[0009] Настоящее изобретение относится к синтетическим белкам оболочки вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), которые имеют повышенную экспрессию на клеточной поверхности и генетическую стабильность по сравнению с ранее описанным антигеном mos2Env, и к новому поксвирусному вектору, содержащему последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую синтетические белки оболочки ВИЧ. Настоящее изобретение также относится к композициям и к способам применения таких новых поксвирусных векторов, содержащих последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую синтетические белки оболочки ВИЧ, для индукции усиленных иммунных ответов против ВИЧ-1, а в частности, ВИЧ-1-кладотипов С и В, предпочтительно при использовании в комбинации с другими ВИЧ-антигенами.

[0010] В своих конкретных аспектах настоящее изобретение относится к поксвирусным векторам, предпочтительно, к векторам модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA), содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую синтетический белок оболочки ВИЧ, а предпочтительно содержащую последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую дополнительные антигены ВИЧ.

[0011] В одном своем общем аспекте настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Синтетический белок оболочки ВИЧ может также содержать сигнальную последовательность, например сигнальную последовательность, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 9-12. В одном варианте осуществления изобретения, сигнальная последовательность имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9.

[0012] В некоторых вариантах осуществления изобретения синтетический белок оболочки ВИЧ также содержит трансмембранный домен, а предпочтительно трансмембранный домен, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления изобретения, синтетический белок оболочки ВИЧ

также содержит фрагмент цитоплазматического домена, а предпочтительно фрагмент цитоплазматического домена, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14, или его N-концевые аминокислоты 1-4 (то есть, NRVR). В вариантах осуществления изобретения, в которых синтетический белок оболочки ВИЧ также содержит трансмембранный домен и фрагмент цитоплазматического домена, предпочтительно, чтобы этот белок также содержал аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, которая присоединена к карбоксильному концу (С-концу) SEQ ID NO: 8 и к амино-концу (N-концу) трансмембранной области.

[0013] В своем наиболее предпочтительном варианте настоящее изобретение относится к поксвирусному вектору, содержащему последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 или аминокислоты 1-686 SEQ ID NO: 19. Наиболее предпочтительно, синтетический белок оболочки ВИЧ, кодируемый нуклеиновой кислотой, содержит, или состоит из нее, аминокислотную последовательности SEQ ID NO: 18.

[0014] В предпочтительных вариантах осуществления изобретения поксвирусный вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую синтетический белок оболочки ВИЧ, описанный выше, и по меньшей мере один дополнительный антиген ВИЧ. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, поксвирусный вектор представляет собой вектор модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA). Наиболее предпочтительно, вектор MVA содержит MVA-BN или его производные.

[0015] В одном предпочтительном варианте осуществления изобретения поксвирусный вектор содержит (a) нуклеиновую кислоту, кодирующую первый антиген оболочки Env (Env), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и предпочтительно, также содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую (b) второй антиген Env ВИЧ, отличающийся от первого антигена Env ВИЧ; (c) третий антиген и четвертый антиген, которые представляют собой два различных антигена Gag ВИЧ; и (d) пятый антиген и шестой антиген, которые представляют собой два различных антигена Pol ВИЧ. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения, (b) второй антиген Env ВИЧ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; (c) третий и четвертый антигены содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, соответственно; и (d) пятый и шестой антигены содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, соответственно. В некоторых вариантах осуществления изобретения, третий и пятый антигены вместе образуют первый гибридный антиген Gag-Pol, предпочтительно содержащий SEQ ID NO: 28; а четвертый и шестой антигены вместе образуют второй гибридный антиген Gag-Pol, предпочтительно содержащий SEQ ID NO: 29. В некоторых конкретных вариантах осуществления изобретения, первый антиген Env ВИЧ кодируется SEQ ID NO: 41. В одном или более конкретных вариантах осуществления изобретения, второй антиген Env ВИЧ кодируется SEQ ID NO: 39; первый гибридный антиген Gag-Pol кодируется SEQ ID

NO: 38; а второй гибридный антиген Gag-Pol кодируется SEQ ID NO: 40.

[0016] В тех вариантах осуществления изобретения, в которых поксвирусный вектор представляет собой вектор MVA, такой как вектор MVA, содержащий MVA-BN или его производные, первый гибридный антиген Gag-Pol и второй антиген Env предпочтительно встраивают в межгенную область (IGR) 44/45 генома MVA, а второй гибридный антиген Gag-Pol и первый антиген Env, предпочтительно, встраивают в IGR 88/89 генома MVA. Более предпочтительно, каждый первый гибридный антиген Gag-Pol и второй гибридный антиген Gag-Pol находится под контролем отдельного промотора, предпочтительно, промотора Pr13.5, и каждый первый антиген Env и второй антиген Env находится под контролем отдельного промотора, предпочтительно промотора PrHyb.

[0017] В другом своем общем аспекте настоящее изобретение относится к композиции, предпочтительно, к вакцинной композиции, включающей иммуногенно эффективное количество поксвирусного вектора, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую синтетический белок оболочки ВИЧ согласно варианту осуществления изобретения, и предпочтительно, также содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более дополнительных антигенов ВИЧ, и носитель, где нуклеиновая кислота, кодирующая синтетический белок оболочки ВИЧ, функционально присоединена к промоторной последовательности. В одном варианте осуществления изобретения, композиция также содержит аденовирусный вектор, а предпочтительно вектор аденовируса 26, кодирующий синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция включает поксвирусный вектор, а предпочтительно, вектор MVA, кодирующий синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и предпочтительно кодирующий другие антигены ВИЧ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции согласно изобретению также содержат дополнительные экспрессионные векторы, кодирующие дополнительные антигены ВИЧ и/или выделенный антигенный полипептид ВИЧ.

[0018] В другом своем общем аспекте настоящее изобретение относится к вакцинной комбинации для индукции иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) у пациента. В одном варианте осуществления изобретения, вакцинная комбинация включает:

(а) первую вакцинную композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество вектора, предпочтительно поксвирусного вектора, а более предпочтительно, вектора MVA, кодирующего (i) первый белок оболочки ВИЧ (Env), представляющий собой синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и предпочтительно, также содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую: (ii) второй антиген Env ВИЧ, отличающийся от первого антигена Env ВИЧ; (iii) третий антиген и четвертый антиген, которые представляют собой два различных антигена Gag ВИЧ; и (iv) пятый антиген и шестой антиген, которые

представляют собой два различных антигена Pol ВИЧ; и по меньшей мере одну из:

(b) (i) второй вакцинной композиции, содержащей иммуногенно эффективное количество одного или более векторов, предпочтительно, одного или более аденовирусных векторов, а более предпочтительно, одного или более векторов аденовируса 26, кодирующих один или более из первого, второго, третьего, четвертого пятого и шестого антигенов ВИЧ, а предпочтительно кодирующих один или более антигенов ВИЧ, содержащих аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-5, 18, 28 и 29; и/или

(b) (ii) третьей вакцинной композиции, содержащей один или более полипептидов, включающих иммуногенно эффективное количество выделенного антигенного полипептида ВИЧ, например, полипептида, содержащего остатки 30-708 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, и/или полипептида, содержащего остатки 30-724 SEQ ID NO: 36,

где первая композиция и вторая и/или третья композиции присутствуют в одной и той же композиции или в одной или более различных композициях.

[0019] В одном варианте осуществления изобретения, где вакцинная комбинация содержит вторую вакцинную композицию, эта вторая вакцинная композиция включает один или более рекомбинантных векторов аденовируса 26, кодирующих один или более антигенов, содержащих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-5, 18, 28 и 29, а более предпочтительно, включает два, три или четыре рекомбинантных вектора аденовируса 26, которые вместе кодируют SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 18.

[0020] В другом своем общем аспекте, настоящее изобретение относится к способам индукции иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) у пациента, где указанные способы включают введение пациенту композиции, такой как вакцинная композиция или комбинация вакцин согласно варианту осуществления изобретения. Настоящее изобретение также относится к способам индукции иммунного ответа против ВИЧ, включающим примирование и усиление иммунного ответа с использованием композиции или комбинации вакцин согласно варианту осуществления изобретения.

[0021] В конкретном варианте осуществления изобретения, способ индукции иммунного ответа против ВИЧ у пациента включает введение пациенту:

(a) первой вакцины, содержащей один или более рекомбинантных аденовирусных векторов, предпочтительно, векторов Ad26, кодирующих одну или более из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 18; и

(b) второй вакцины, содержащей поксвирусный вектор, а предпочтительно, вектор MVA, кодирующий первый белок оболочки ВИЧ (Env), представляющий собой синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, а предпочтительно, кодирующий дополнительные антигены ВИЧ, предпочтительно, второй антиген Env ВИЧ, который отличается от первого антигена Env

ВИЧ; третий антиген и четвертый антиген, которые представляют собой два различных антигена Gag ВИЧ, и пятый антиген и шестой антиген, которые представляют собой два различных антигена Pol ВИЧ, а более предпочтительно один или более антигенов ВИЧ, кодирующих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-5, 28 и 29,

где первая вакцина представляет собой примирующую вакцину, а вторая вакцина представляет собой бустер-вакцину, или где вторая вакцина представляет собой примирующую вакцину, а первая вакцина представляет собой бустер-вакцину. В некоторых вариантах осуществления изобретения, один или более выделенных антигенных полипептидов ВИЧ, предпочтительно содержащих иммуногенно эффективное количество выделенного антигенного полипептида ВИЧ, например, полипептида, содержащего остатки 30-708 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, и/или полипептида, содержащего остатки 30-724 SEQ ID NO: 36, вводят пациенту приблизительно одновременно в одной композиции с бустер-вакциной, или в отдельной композиции, не содержащей бустер-вакцины.

[0022] В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к клетке, предпочтительно, к выделенной клетке, содержащей вектор согласно варианту осуществления изобретения.

#### **Краткое описание некоторых изображений на чертежах**

[0023] Приведенное выше краткое описание, а также последующее подробное описание изобретения будет более понятным при чтении вместе с прилагаемыми чертежами. Следует отметить, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными вариантами его осуществления, представленными на чертежах.

[0024] В чертежах:

[0025] На фиг. 1А-1С схематически представлена структура белков оболочки ВИЧ; на фиг. 1А показан полноразмерный белок оболочки ВИЧ; На фиг. 1В показана структура растворимого одноцепочечного белка оболочки ВИЧ согласно варианту осуществления изобретения, в котором трансмембранный домен (ТМ) заменен доменом тримеризации GCN4, а сайт расщепления фурином является мутированным (sC4); на фиг. 1С показана структура мембраносвязанного белка оболочки ВИЧ согласно варианту осуществления изобретения, содержащего трансмембранный домен и фрагмент цитоплазматического домена (C4D7);

[0026] На фиг. 2 показаны уровни экспрессии растворимого белка оболочки ВИЧ sC1, который основан на последовательности мозаичного антигена mos2Env с дополнительным С-концевым доменом тримеризации, и растворимого синтетического белка оболочки ВИЧ (sC4) согласно варианту осуществления изобретения; экспрессию измеряли с помощью количественного вестерн-блот-анализа с использованием поликлонального антитела против gp120; плазмиды, кодирующие sC1 или sC4, были транзientно экспрессированы дважды; и каждую трансфекцию количественно определяли два раза с помощью денситометрического анализа; белок sC1 обнаруживал очень низкие



уровни экспрессии по сравнению с синтетическим белком оболочки ВИЧ sC4, который показал относительно высокие уровни экспрессии;

[0027] На фиг. 3А и 3В проиллюстрировано связывание синтетических белков оболочки ВИЧ с моноклональным антителом 17b (mAb17b) в присутствии (светло-серый) и в отсутствие (темно-серый) растворимого CD4, как было определено с помощью анализа ELISA; на фиг. 3А проиллюстрировано связывание sC1; на фиг. 3В проиллюстрировано связывание sC4;

[0028] На фиг. 4 представлено изображение вестерн-блота, полученного с помощью электрофореза в нативном полиакриламидном геле для белка sC1 и синтетического белка оболочки ВИЧ sC4;

[0029] На фиг. 5 показаны относительные уровни экспрессии мембраносвязанных синтетических белков оболочки ВИЧ C1, C1D7, C4 и C4D7 на клеточной поверхности, оцененные с помощью FACS-анализа клеток, экспрессирующих эти белки, и с использованием поликлонального антитела против gp120 (GP120), и анализа на связывание с нейтрализующими антителами широкого ряда PG9 (PG9) и PG16 (PG16), связывание которых зависит от четвертичной структуры, и которые предпочтительно связываются с правильно уложенным тримером Env;

[0030] На фиг. 6 графически представлена стабильность аденовирусных векторов, содержащих последовательности, кодирующие синтетические белки оболочки ВИЧ согласно изобретению, включая полноразмерные C4 (FLC4), C4D7 и sC4, после множества вирусных пассажей; векторы рекомбинантного аденовируса 26 были получены в клетках PER.C6; после первых 3 пассажей для трансфекции и очистки методом бляшек было отобрано 5 бляшек, которые были масштабированы в течение 10 пассажей в формате T25, в результате чего, общее число вирусных пассажей (vpn) составляло 13; при этом, показана стабильность после 3, 5, 10 и 13 vpн, как было определено с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) трансгенного кластера E1; например, 3/5 означает, что из 5 протестированных бляшек стабильными были 3 бляшки, а 5/5 означает, что из 5 протестированных бляшек, стабильными были 5 бляшек;

[0031] На фиг. 7А и 7В показаны титры нейтрализации против псевдотипированных вирусных частиц оболочки ВИЧ-1 (EVP) в анализе на нейтрализацию с использованием кроличьих клеток TZM-bl; логарифмические ( $\log_{10}$ ) значения  $IC_{50}$  для групп, которым вводили высокую дозу аденовирусного вектора, вычисляли по сравнению с EVP VSV-G (негативным контролем) и MW965.26 (класса 1А кладотипа С) на недели 1, 8, 14 и 20; каждая точка означает логарифмическое ( $\log_{10}$ ) значение  $IC_{50}$  для отдельного кролика, где среднее значение для группы показано горизонтальной линией; HD: наибольшее тестируемое разведение (верхняя сплошная линия); LD: самое низкое тестируемое разведение (нижняя сплошная линия); LOB: предел фона, величина 95-го перцентиля скомпилированной отрицательной выборки (пунктирная линия); значения  $IC_{50}$   $\log_{10}$ , превышающие порог LD или HD, были отложены на соответствующей линии; для каждого временного отрезка было сделано одностороннее

непараметрическое сравнение с контролем с применением метода Данна для совместного ранжирования; статистически значимые различия указаны на графиках: \* =  $P < 0,05$ , \*\* =  $P < 0,01$  и \*\*\* =  $P < 0,001$ ; на фиг. 7А представлены результаты с VSV-G (негативный контроль); и на фиг. 7В показаны результаты с MW965.26 (класс 1А, кладотипа С).

[0032] На фиг. 8 графически представлены вставки в указанные положения генома MVA для вектора MVA-mBN414; Pr13.5 и PrHub являются промоторными последовательностями; IGR являются межгенными областями;

[0033] На фиг. 9А, 9В и 9С проиллюстрированы иммунные ответы у кроликов на 85-й день после иммунизации Ad26.Mos.HIV (сокращенно Ad26), отдельно или в комбинации с MVA-mBN414 (на фиг.9А-9С, сокращенно «MVA»), gp140 кладотипа С (сокращенно GP140) или их комбинацией; самцы (М) и самки (F) показаны отдельно; на фиг. 9А и 9В показаны титры ELISA, специфичные к gp140 кладотипа С и к мозаичному gp140, соответственно; каждая точка означает логарифмическое ( $\log_{10}$ ) относительное значение активности ( $\log_{10}$  ЭЕ/мл) для отдельного кролика, причем среднее для группы обозначено горизонтальной линией; ULOQ, верхний предел количественной оценки (верхняя сплошная линия), LLOQ нижний предел количественной оценки (нижняя сплошная линия), LOB, предел фона (пунктирная линия); все значения ниже LOB были установлены на уровне LOB; статистический анализ состоял из межполовой модели Тобита; для сравнения групп 1, 2 и 3 была применена поправка Тьюки; статистически значимые различия указаны на графиках: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ; на фиг. 9С показаны титры нейтрализации вируса против псевдотипированных вирусных частиц оболочки VaL ВИЧ-1 в анализе на нейтрализацию на основе клеток TZM-bl с использованием кроличьей сыворотки; каждая точка означает логарифмическое ( $\log_{10}$ ) значение  $IC_{50}$  для отдельного кролика, причем, среднее для группы обозначено горизонтальной линией; HD: наибольшее тестируемое разведение (верхняя сплошная линия); LD: самое низкое тестируемое разведение (нижняя сплошная линия); LOB: предел фона, величина 95-го перцентиля скомпилированной отрицательной выборки (пунктирная линия); значения  $IC_{50}$   $\log_{10}$ , превышающие порог LD или HD, были отложены на соответствующей линии; статистический анализ состоял из межполовой модели Тобита; для сравнения групп 1, 2 и 3 была применена поправка Тьюки; статистически значимые различия указаны на графиках: \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$ ; и

[0034] На фиг. 10А-10Е показаны иммунные ответы у мышей только после первичной иммунизации (неделя 5) или прайм-буст-иммунизации (неделя 7) Ad26.Mos4.HIV (сокращенно Ad26) с последующей прайм-буст-иммунизацией MVA-mBN414 или прайм-буст-иммунизацией гомологичным MVA-mBN414 (сокращенно на фиг. 10А-10Е «MVA»); Группы 1 и 2 были примированы на неделю 0 путем введения  $2,5 \times 10^9$  или  $2,5 \times 10^8$  вирусных частиц Ad26.Mos4.HIV, соответственно, а затем на 5 неделю им вводили бустер-дозы  $2,8 \times 10^6$  или  $2,8 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> MVA-mBN414, соответственно; Группы 3 и 4 были иммунизированы на неделю 0 и на неделю 5  $2,8 \times 10^6$  или  $2,8 \times 10^5$  TCID<sub>50</sub> MVA-mBN414, соответственно; Группа 5 (контроль) была

примирована  $2,5 \times 10^9$  Ad26.empty, а затем была введена бустер-доза  $2,8 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> MVA-BN-empty; на фиг. 10А и 10В показаны титры ELISA, специфичные к мозаичному gp140; каждая точка означает логарифмическое ( $\log_{10}$ ) значение титра конечной точки для отдельной мыши, причем, среднее для группы обозначено горизонтальной линией; UD: верхний предел разведения; LD: самое низкое разведение; все величины ниже LD установлены на уровне LD; статистический анализ состоял из межполовой модели Тобита; статистически значимые различия указаны на графиках: \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001; на фиг. 10С-10Е показаны данные анализа ELISPOT на интерферон-гамма (IFN- $\gamma$ ) на 7-ой неделе исследования; каждая точка представляет число клеток, образующих пятно (SFC) на  $10^6$  спленоцитов отдельной мыши, где среднее для группы обозначено горизонтальной линией; LOD: предел детектирования, 95-й перцентиль для скомпилированных нестимулированных контролей (пунктирная линия); Env-, Gag- и Pol-специфические ответы определяли путем стимуляции иммунодоминантными Env-, Gag- и Pol-пептидами IHGPGRAFYTAGDI (SEQ ID NO: 44), AMQMLKETI (SEQ ID NO: 45) и YYDPSKDLI (SEQ ID №: 46), соответственно; статистически значимые различия указаны на графиках: \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\*P < 0,001.

#### **Подробное описание изобретения**

[0035] Различные публикации, статьи и патенты цитируются или описываются в разделе «Предшествующий уровень техники» и во всем описании изобретения, где каждый из этих документов включен в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. Обсуждение документов, законов, материалов, устройств, статей или т.п., которые были включены в настоящее описание, приводится в целях их представления в соответствии с контекстом изобретения. Такое обсуждение не является признанием того, что какие-либо или все эти предметы изобретения являются частью предшествующего уровня техники, относящейся к любым, раскрытым или заявленным изобретениям.

[0036] Если это не оговорено особо, то все используемые здесь технические и научные термины имеют общепринятые значения, понятные специалисту в области, к которой относится изобретение. В противном случае, определенные термины, используемые в настоящей заявке, имеют значения, указанные в описании. Все патенты, опубликованные патентные заявки и публикации, цитируемые в данном документе, включены посредством ссылки, как если бы они были изложены полностью в настоящем документе. Следует отметить, что используемые здесь и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа «a», «an» и «the» включают формы множественного числа, если это явно не противоречит контексту изобретения.

[0037] В данном описании и в прилагаемой формуле изобретения, если это не противоречит контексту настоящего изобретения, слово «содержать» и такие его варианты, как «содержит» и «содержащий», подразумевают включение указанного целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий, но не исключение любого другого целого числа или стадии или группы целых чисел или стадий. Используемый здесь термин «включающий» может быть заменен термином «содержащий» или «включая» или, иногда,

в настоящем описании используется термин «имеющий».

[0038] Используемый здесь термин «состоящий из» исключает любой элемент, стадию или ингредиент, не указанный как признак формулы изобретения. Используемый здесь термин «состоящий по существу из» не исключает материалы или стадии, которые не оказывают существенного влияния на основные и новые признаки формулы изобретения. Любой из вышеупомянутых терминов «включающий», «включая», «содержащий» и «имеющий», каждый раз, когда он используется в контексте аспекта или варианта осуществления изобретения, может быть заменен термином «состоящий из» или «состоящий, по существу из» в целях изменения объема раскрытия изобретения.

[0039] Используемый здесь термин «и/или», который употребляется между множеством перечисленных элементов, следует понимать как охватывающий индивидуальные и комбинированные варианты. Так, например, если два элемента объединены составным союзом «и/или», то первый вариант их применения включает использование первого элемента без второго элемента. Второй вариант применения включает использование второго элемента без первого элемента. Третий вариант применения включает использование первого и второго элементов вместе. При этом, предполагается, что любой из этих вариантов будет входить в это определение, и, следовательно, удовлетворять требуемому значению словосочетания «и/или», используемого в данном документе. При этом очевидно, что одновременная применимость более, чем одного из указанных вариантов соответствует смыслу и, следовательно, удовлетворяет требуемому значению словосочетания «и/или».

[0040] Используемый здесь термин «пациент» означает любое животное, предпочтительно млекопитающее, наиболее предпочтительно человек, которому будет или был введен вектор, композиция или вакцинная комбинация в соответствии с вариантами осуществления изобретения. Используемый здесь термин «млекопитающее» охватывает любое млекопитающее. Примерами млекопитающих являются, но не ограничиваются ими, коровы, лошади, овцы, свиньи, кошки, собаки, мыши, крысы, кролики, морские свинки, обезьяны, человек и т.п., а более предпочтительно, человек.

[0041] В общих чертах, настоящее изобретение относится к синтетическим белкам оболочки ВИЧ, нуклеиновым кислотам и векторам, кодирующим синтетические белки оболочки ВИЧ, и к способам индукции иммунного ответа против ВИЧ с помощью векторов, кодирующих синтетические белки оболочки ВИЧ и, необязательно, кодирующих дополнительные антигены ВИЧ, отдельно или в комбинации с одним или более дополнительными векторами, кодирующими один или более дополнительных антигенов ВИЧ, и/или в комбинации с одним или более дополнительными отдельными антигенными полипептидами ВИЧ.

[0042] Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) является членом рода *Lentivirinae*, который представляет собой часть семейства *Retroviridae*. Человека поражают ВИЧ двух видов: ВИЧ-1 и ВИЧ-2. ВИЧ-1 является наиболее распространенным штаммом вируса ВИЧ, и известно, что он является более патогенным, чем ВИЧ-2. Используемые здесь

термины «вирус иммунодефицита человека» и «ВИЧ» означают, но не ограничиваются ими, ВИЧ-1 и ВИЧ-2.

[0043] ВИЧ подразделяется на несколько клодотипов с высокой степенью генетической дивергенции. Используемый здесь термин «кладотип ВИЧ» или «подтип ВИЧ» относится к родственным вирусам иммунодефицита человека, классифицированным по степени их генетического сходства. В настоящее время известны три группы изолятов ВИЧ-1: М, N и О. Группа М (основные штаммы) состоит по меньшей мере из десяти кладотипов, А-J. Группа О (другие штаммы) может состоять из аналогичного числа кладотипов. Группа N представляет собой новый изолят ВИЧ-1, который не был отнесен ни к одной из групп М или О.

[0044] Используемые здесь термины «антигенный полипептид ВИЧ», «антигенный белок ВИЧ», «антиген ВИЧ» и «иммуноген ВИЧ» относятся к полипептиду, способному индуцировать иммунный ответ, например, гуморальный и/или клеточно-опосредованный ответ против ВИЧ у пациента. Антигенный полипептид или антиген может представлять собой белок ВИЧ, его фрагмент или эпитоп или комбинацию множества белков ВИЧ или их частей, которые могут индуцировать иммунный ответ или вырабатывать иммунитет, например, протективный иммунитет против ВИЧ у пациента.

[0045] Предпочтительно, антигенный полипептид или антиген способен вырабатывать у хозяина протективный иммунный ответ, например, индуцировать иммунный ответ против вирусного заболевания или вирусной инфекции и/или вырабатывать иммунитет у пациента (то есть, посредством вакцинации) против вирусного заболевания или вирусной инфекции, который защищает пациента от вирусного заболевания или вирусной инфекции. Так, например, антигенный полипептид или антиген может содержать белок или его фрагменты, происходящие от вируса иммунодефицита обезьян (SIV) или ВИЧ, такие как белок gp160 оболочки ВИЧ или SIV, матриксные/капсидные белки ВИЧ или SIV или продукты генов gag, pol и env ВИЧ или SIV.

[0046] Антигенный полипептид или антиген ВИЧ может представлять собой любой антиген ВИЧ-1 или ВИЧ-2 или его фрагмент. Примеры антигенов ВИЧ включают, но не ограничиваются ими, генные продукты gag, pol и env, которые кодируют структурные белки и важные ферменты. Продукты генов gag, pol и env синтезируются как полипротеины, которые затем процессируются во множество других белковых продуктов. Первичным белковым продуктом гена gag является полипротеин вирусного структурного белка gag, который затем процессируется в белковые продукты MA, CA, SP1, NC, SP2 и P6. Ген pol кодирует вирусные ферменты (Pol, полимеразу), а затем первичный белковый продукт процессируется в белковые продукты RT, RNКазы H, IN и PR. Ген env кодирует структурные белки, а в частности, гликопротеины оболочки вириона. Первичным белковым продуктом гена env является gp160, который затем процессируется в gp120 и gp41. Другие примеры антигенов ВИЧ включают генные регуляторные белки Tat и Rev; вспомогательные белки Nef, Vpr, Vif и Vpr; капсидные белки, нуклеокапсидные белки и

вирусный белок p24.

[0047] В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигенный полипептид или антиген ВИЧ содержит антиген Gag, Env или Pol ВИЧ или любую их антигенную часть или эпитоп или их комбинацию, предпочтительно, антиген Gag, Env или Pol ВИЧ-1 или любую антигенную часть или эпитоп или их комбинацию.

[0048] Антигенные полипептиды ВИЧ могут быть также мозаичными антигенами ВИЧ. Используемый здесь термин «мозаичный антиген» означает рекомбинантный белок, собранный из фрагментов природных последовательностей. Мозаичные антигены напоминают природные антигены, но являются оптимизированными для максимального охвата потенциальных Т-клеточных эпитопов, присутствующих в природных последовательностях, что увеличивает широту и охват иммунного ответа. Мозаичные антигены ВИЧ для их использования в настоящем изобретении предпочтительно представляют собой мозаичные антигены Gag, Pol и/или Env, а более предпочтительно мозаичные антигены Gag, Pol и/или Env ВИЧ-1. Используемый здесь термин «мозаичный антиген Gag, Pol и/или Env», в частности, означает мозаичный антиген, содержащий множество эпитопов, происходящих от одной или более полипротеиновых последовательностей Gag, Pol и/или Env ВИЧ.

[0049] В одном варианте осуществления изобретения, мозаичный антиген ВИЧ для его использования в настоящем изобретении представляет собой мозаичный антиген Gag ВИЧ с эпитопами, происходящими от последовательностей продуктов гена gag (примеры представлены в SEQ ID NO: 1, 2); мозаичный антиген Pol ВИЧ с эпитопами, происходящими от последовательностей продуктов гена pol (примеры приведены в SEQ ID NO: 3, 4); или мозаичный антиген Env ВИЧ с эпитопами, происходящими от последовательностей продуктов гена env (примеры представлены в SEQ ID NO: 5, 6; и кроме того, синтетические антигены согласно изобретению, например, в SEQ ID NO: 8, 17, 18, 19, могут рассматриваться как мозаичные антигены Env ВИЧ). В некоторых вариантах осуществления изобретения, мозаичный антиген ВИЧ для его использования в настоящем изобретении, содержит комбинацию эпитопов, происходящих от последовательностей продуктов генов gag, pol и/или env. Иллюстративные и неограничивающие примеры включают мозаичные антигены Env-Pol с эпитопами, происходящими от последовательностей продуктов генов env и pol; мозаичные антигены Gag-Pol с эпитопами, происходящими от последовательностей продуктов гена gag и pol (примеры приведены в SEQ ID NO: 28, 29); и мозаичные антигены Gag-Env с эпитопами, происходящими от последовательностей продуктов гена gag и env. Последовательности продуктов генов gag, pol и env могут происходить от одного или более клонотипов.

[0050] Примерами мозаичных антигенов Gag, Pol и/или Env ВИЧ, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, являются антигены, описанные, например, в US20120076812; и публикациях Barouch et al., Nat Med 2010, 16: 319-323; и Barouch et al., Cell 155: 1-9, 2013, которые включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Предпочтительно, мозаичные антигены Gag, Pol и/или Env ВИЧ для

использования в настоящем изобретении включают, но не ограничиваются ими, mos1Gag (SEQ ID NO: 1), mos2Gag (SEQ ID NO: 2), mos1Pol (SEQ ID NO 3), mos2Pol (SEQ ID NO: 4), mos1Env (SEQ ID NO: 5), mos2Env (SEQ ID NO: 6), mos1GagPol (SEQ ID NO: 28), mos2GagPol (SEQ ID NO: 29) и их комбинации.

[0051] Каждый из используемых здесь терминов «белок оболочки ВИЧ», «белок env» и «Env» означает белок, который экспрессируется на оболочке вириона ВИЧ и позволяет ВИЧ нацеливаться на плазматическую мембрану и связываться с плазматической мембраной ВИЧ-инфицированных клеток, или его фрагмент или производное, которые могут индуцировать иммунный ответ или вырабатывать иммунитет против ВИЧ у пациента. Ген env ВИЧ кодирует белок-предшественник gp160, который протеолитически расщепляется на два зрелых гликопротеина оболочки, gp120 и gp41. Реакция расщепления опосредуется протеазой клетки-хозяина, фурином, в последовательности, которая является высококонсервативной в предшественниках гликопротеина ретровирусной оболочки. Более конкретно, gp160 подвергается тримеризации в  $(gp160)_3$ , а затем подвергается расщеплению на два нековалентно связанных gp120 и gp41. Затем, проникновение вируса опосредуется тримером гетеродимеров gp120/gp41. Gp120 является фрагментом, связывающимся с рецептором, и связывается с рецептором CD4 на клетке-мишени, которая имеет такой рецептор, например, на Т-хелперной клетке. Gp41, который нековалентно связан с gp120, представляет собой фрагмент гибрида и способствует осуществлению второй стадии, в которой ВИЧ проникает в клетку. По своей природе, Gp41 скрыт в вирусной оболочке, но когда gp120 связывается с рецептором CD4, gp120 меняет свою конформацию, что делает gp41 доступным для слияния с клеткой-хозяином. Gp140 представляет собой нерасщепленный эктодомен тримерного gp160, то есть  $(gp160)_3$ , который используется в качестве суррогата для преобразования расщепленного вирусного шипа в нативную форму.

[0052] В соответствии с вариантами осуществления изобретения, «белок оболочки ВИЧ» может представлять собой белок gp160, gp140, gp120, gp41, их комбинации, гибриды, усеченные варианты или производные. Так, например, «белок оболочки ВИЧ» может включать белок gp120, нековалентно связанный с белком gp41. Он также может включать стабилизированный тримерный белок gp140, который может иметь домен тримеризации или может быть модифицирован так, чтобы он включал домен тримеризации, который стабилизирует тримеры gp140. Примерами доменов тримеризации являются, но не ограничиваются ими, домен тримеризации, «уложенный» в виде T4-фибринина; суперспирализованный домен тримеризации, происходящий от GCN4; и каталитическая субъединица аспартат-транскарбамоилазы E.coli в качестве тримерной метки. «Белок оболочки ВИЧ» также может представлять собой усеченный белок оболочки ВИЧ, включая, но не ограничиваясь ими, белки оболочки, содержащие С-концевые усечения в эктодоме (то есть, в домене, который простирается во внеклеточное пространство), усечение в gp41, такое как усечение в трансмембранном

домене gp41 или усечение в цитоплазматическом домене gp41. «Белок оболочки ВИЧ» может также представлять собой производное природного белка оболочки ВИЧ, имеющего мутации в последовательности, например, в сайтах расщепления фурином, и/или так называемые мутации SOSIP.

[0053] Предпочтительно, «белок оболочки ВИЧ» представляет собой «синтетический белок оболочки ВИЧ». Используемый здесь термин «синтетический белок оболочки ВИЧ» означает неприродный белок оболочки ВИЧ, который оптимизирован для индукции иммунного ответа или выработки иммунитета против одного или более природных штаммов ВИЧ у пациента. Мозаичные белки Env ВИЧ являются примерами синтетических белков Env ВИЧ, и настоящее изобретение относится к синтетическим антигенам Env ВИЧ, например, к антигенам, содержащим SEQ ID NO: 8, 17, 18 или 19.

[0054] Используемый здесь термин «TCID<sub>50</sub>» означает инфекционную 50%-ную дозу для тканевой культуры, обозначаемую как TCID<sub>50</sub>. TCID<sub>50</sub> может быть определена различными методами, известными специалистам в данной области, такими как, например, анализ на инфекционную 50%-ную дозу для тканевой культуры (TCID<sub>50</sub>). Анализ на TCID<sub>50</sub> представляет собой метод титрования инфекционности векторов модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA) с использованием 10-кратных разведений в 96-луночном формате, как описано в примере 2 WO 03/053463. Инфекционность поксвируса, такого как MVA, может быть определена различными методами, известными специалистам, такими как, например, анализ на основе проточной цитометрии или анализ на инфекционную 50%-ную дозу для тканевой культуры (TCID<sub>50</sub>). В одном репрезентативном аспекте, титрование MVA осуществляют в анализе на основе TCID<sub>50</sub> с использованием 10-кратных разведений в 96-луночном формате. По окончании анализа, инфицированные клетки визуализируют с помощью антитела против вируса осповакцины и с использованием соответствующего окрашивающего раствора. Первичные клетки CEF приготавливают и культивируют в среде RPMI, включающей 10% сыворотку и 1% гентамицин, с использованием T-колб в течение 2-3 дней при заданной плотности после трипсинизации и высевания в 96-луночные планшеты с плотностью  $1 \times 10^5$  клеток/мл, с использованием RPMI с 7% сывороткой. Ожидаемый титр образца определяет количество 10-кратных серийных разведений, которые осуществляют в планшете с глубокими лунками от колонки 1 до, например, 10 с использованием 100 мкл для переноса в следующую лунку. После разведения высевают 100 мкл на лунку 96-луночного планшета. Клетки инкубируют в течение 5 дней при 34-38°C и 4-6% CO<sub>2</sub> для обеспечения инфицирования и репликации вируса.

[0055] Через пять дней после инфицирования, клетки окрашивают MVA-специфическим антителом. Для детектирования специфического антитела используют «второе» антитело, конъюгированное с пероксидазой хрена (ПХ). MVA-специфическое антитело может представлять собой, например, антитело против вируса осповакцины, поликлональное кроличье антитело или фракцию IgG (Quartett, Berlin, Germany # 9503-



2057). «Вторым» антителом может быть, например, антитело против кроличьего IgG или поликлональное козье антитело, связанное с ПХ (Promega, Mannheim, Germany, # W4011). «Второе» антитело визуализируют с использованием осаждающего субстрата ТМВ. Каждую лунку с клетками, которая является позитивной по цветовой реакции, помечают как позитивную для вычисления TCID<sub>50</sub>. Титр определяют методом вычисления Спирмена-Кербера. Данные также могут быть представлены как log титра вируса, который представляет собой относительную разность для любого заданного момента времени от момента времени, начиная с T=0.

[0056] Альтернативным методом количественной оценки концентрации вируса является анализ методом вирусных бляшек, который представляет собой стандартный метод, хорошо известный специалистам для определения концентрации вируса с точки зрения инфекционной дозы. Вкратце, конфлюэнтный монослой клеток-хозяев инфицируют вирусом в различных разведениях и покрывают полутвердой средой. Вирусная бляшка образуется в том случае, когда вирус инфицирует клетку в клеточном монослое, и число бляшек можно подсчитать вместе с коэффициентом разведения для определения числа бляшкообразующих единиц на объем образца (БОЕ/мл). БОЕ/мл означает число инфекционных частиц в образце. Из-за различий в методах и принципах анализа, TCID<sub>50</sub> и БОЕ/мл или другие результаты анализа на инфекционность необязательно должны быть эквивалентными. Для MVA могут быть использованы оба метода (TCID<sub>50</sub> и анализ методом вирусных бляшек), и, обычно, доза вектора MVA для клинического введения человеку выпадает в БОЕ или TCID<sub>50</sub>. Доза аденовирусного вектора может быть также указана в БОЕ или TCID<sub>50</sub>. Для введения человеку, обычно, доза аденовирусного вектора указывается в вирусных частицах (ВЧ), а концентрацию выражают в ВЧ/мл.

#### Синтетические белки оболочки ВИЧ и кодирующие их последовательности

[0057] Варианты осуществления изобретения относятся к новым поксвирусным векторам, предпочтительно к векторам MVA, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую синтетические белки оболочки ВИЧ, и предпочтительно содержащие последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую дополнительные антигены ВИЧ.

[0058] В одном варианте осуществления изобретения, синтетический белок оболочки ВИЧ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 или SEQ ID NO: 8, имеющую одну или более мутаций, выбранных из группы, состоящей из (i) I529P, (ii) K480E и (iii) комбинации EK479-480RRRR, I529P, A471C и T575C. SEQ ID NO: 8 содержит синтетический зрелый gp120 и синтетический усеченный gp41 без трансмембранной области и без цитоплазматического домена. SEQ ID NO: 8 представляет собой неприродную последовательность, состоящую из химерных последовательностей, происходящих от мозаичного антигена mos2Env (SEQ ID NO: 6) и других последовательностей белка оболочки ВИЧ. Последовательность синтетического антигена Env, содержащая SEQ ID NO: 8, была оптимизирована для обеспечения широкого охвата и

усиления Т-клеточного ответа против ВИЧ кладотипа С (по сравнению с антигеном mos2Env (SEQ ID NO: 6)). В некоторых вариантах осуществления изобретения, дополнительные аминокислоты могут быть добавлены в SEQ ID NO: 8 или в один из ее вариантов, определенных в настоящей заявке.

[0059] В некоторых вариантах осуществления изобретения, синтетический белок оболочки ВИЧ дополнительно содержит сигнальную последовательность. Синтетический белок оболочки ВИЧ синтезируют с использованием сигнальной последовательности, которая отщепляется от растущей полипептидной цепи во время ее транспорта в просвет эндоплазматического ретикула (ER). В принципе, может быть использована любая известная сигнальная последовательность. Предпочтительно используется сигнальная последовательность Env ВИЧ или ее вариант. Для белков Env ВИЧ были использованы различные сигнальные последовательности, описанные в литературе (см., например, WO 2014/107744). В некоторых вариантах осуществления изобретения, сигнальная последовательность содержит SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12. В одном предпочтительном варианте осуществления изобретения, сигнальная последовательность содержит SEQ ID NO: 9.

[0060] В некоторых вариантах осуществления изобретения, синтетический белок оболочки ВИЧ дополнительно содержит трансмембранный домен. Трансмембранный домен заякоривает синтетический белок оболочки ВИЧ на мембране ER и способствует сборке мембраны и функционированию оболочки ВИЧ. Предпочтительно, трансмембранный домен содержит SEQ ID NO: 13.

[0061] В другом варианте осуществления изобретения, синтетический белок оболочки ВИЧ содержит gp41, имеющий усеченный цитоплазматический домен. gp41 имеет необычно длинный цитоплазматический домен на своем карбоксильном конце, составляющий обычно приблизительно 150 аминокислот (Edwards et al., J. Virology, 2002, 76: 2683-2691). Сообщалось, что усечение цитоплазматического домена индуцирует доступность консервативных областей в эктодомене белка Env ВИЧ-1 (см. там же). Усеченный цитоплазматический домен в синтетической оболочке ВИЧ согласно изобретению может составлять от одной до приблизительно 140 аминокислот, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130 или 140 аминокислот полноразмерного цитоплазматического домена. В некоторых вариантах осуществления изобретения, усеченный цитоплазматический домен происходит от аминокислот 704-862 SEQ ID NO: 17 (то есть, от цитоплазматического домена молекулы С4 согласно изобретению) в результате усечения в положении после данной аминокислоты и до С-конца. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, синтетический белок оболочки ВИЧ содержит усеченный цитоплазматический домен, имеющий от 1 до 10 аминокислотных остатков, более предпочтительно от 4 до 8 аминокислотных остатков, а наиболее предпочтительно 7 аминокислотных остатков цитоплазматического домена gp41 ВИЧ. Цитоплазматический домен или фрагмент синтетического белка оболочки ВИЧ расположен у С-конца внеклеточного домена

(эктодомена), и если синтетический белок оболочки ВИЧ также содержит трансмембранный домен, то цитоплазматический домен или его фрагмент расположен у С-конца трансмембранного домена. См., например, фиг. 1А и 1С. В конкретном варианте осуществления изобретения, синтетический белок оболочки ВИЧ содержит gp41 с усеченным цитоплазматическим доменом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 или его фрагмент, такой как остатки 1-4 (то есть, NRVR). Были описаны и могут быть использованы и другие усеченные цитоплазматические домены (например, Schiernle et al., PNAS 1997; Abrahamyan et al., J Virol 2005).

[0062] В тех вариантах осуществления изобретения, где синтетический белок оболочки ВИЧ также содержит трансмембранный домен и фрагмент цитоплазматического домена, предпочтительно, чтобы белок также содержал аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, которая содержит остатки 655-682 SEQ ID NO: 18, где аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 37 присоединена к С-концу SEQ ID NO: 8 и к N-концу трансмембранного домена.

[0063] В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения, синтетический белок оболочки ВИЧ также содержит трансмембранный домен, такой как домен, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и усеченный цитоплазматический домен или его фрагмент, такой как последовательность, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14 или остатки 1-4 SEQ ID NO: 14 (то есть, NRVR). Наиболее предпочтительно, синтетический белок оболочки ВИЧ содержит, или состоит из нее, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 в присутствии или в отсутствии сигнальной последовательности (то есть, аминокислотные остатки 1-29 SEQ ID NO: 18).

[0064] В другом варианте осуществления изобретения, синтетический белок оболочки ВИЧ содержит домен тримеризации, который заменяет трансмембранную область Env. Домен тримеризации повышает стабильность тримерной структуры Env. Предпочтительно, синтетический белок оболочки ВИЧ содержит полипептид gp140, который был модифицирован так, чтобы он включал домен тримеризации, который стабилизирует тримеры gp140. Примерами доменов тримеризации являются, но не ограничиваются ими, домен тримеризации, «уложенный» в виде T4-фибритина, то есть, домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; суперспирализованный домен тримеризации, происходящий от GCN4, такой как домен, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15; каталитическая субъединица аспартат-транскарбамоилазы E.coli в качестве тримерной метки или мотивы тримеризации на основе матрилина. Домен тримеризации, если он присутствует, обычно расположен у С-конца внеклеточного домена (см. Фиг. 1В). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения, если синтетический белок оболочки ВИЧ содержит домен тримеризации, то синтетический белок оболочки ВИЧ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 в присутствии или в

отсутствии сигнальной последовательности (то есть, аминокислотные остатки 1-29 SEQ ID № 19). Эти варианты с доменами тримеризации являются особенно подходящими для растворимых вариантов эктодомена синтетического белка оболочки ВИЧ. В некоторых вариантах таких растворимых вариантов согласно изобретению можно мутировать сайт расщепления фурином (например, путем замены Lys на Glu в положении 480 в SEQ ID NO: 8) для инактивации этого сайта расщепления, так, чтобы белок представлял собой одиночную цепь, что хорошо сочетается с доменом тримеризации, особенно с доменом тримеризации GCN4 SEQ ID NO: 19.

[0065] Альтернативные варианты таких растворимых вариантов эктодомена синтетического белка оболочки ВИЧ, в которых не используются домены тримеризации согласно изобретению, также являются вариантами осуществления изобретения, и эти варианты могут быть получены из SEQ ID NO: 8 путем объединения мутаций, оптимизирующих сайт расщепления фурином (например, замены дипептида Gly-Lys в положениях 479-480 четырьмя остатками Arg), а также так называемых мутаций SOSIP (например, замены I на P в положении 529 и введения дисульфидного мостика между положениями 471 и 575 путем замены каждого соответствующего остатка Ala и Thr в этих положениях SEQ ID NO: 8, на остаток Cys). В результате образуется белок, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 со следующей комбинацией мутаций: EK479-480RRRR, I529P, A471C и T575C.

[0066] Одной из возможных модификаций для дальнейшего увеличения содержания тримера в синтетическом белке оболочки ВИЧ согласно изобретению (содержащего SEQ ID NO: 8) является замена Ile на Pro в положении 529. Это может быть эффективным как для растворимых, так и для мембраносвязанных вариантов.

#### [0067] Векторы

[0068] В одном своем общем аспекте, изобретение относится к векторам, содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую синтетический белок оболочки ВИЧ, а предпочтительно содержащим последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один дополнительный антиген ВИЧ. В соответствии с вариантами осуществления изобретения, векторы могут содержать любой из описанных здесь синтетических белков оболочки ВИЧ. В конкретном варианте осуществления изобретения, вектор представляет собой поксвирусный вектор, а предпочтительно вектор MVA, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 19, а более предпочтительно SEQ ID NO: 18 или аминокислотные остатки 30-711 SEQ ID NO: 18.

[0069] Согласно вариантам осуществления изобретения, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую синтетический белок оболочки ВИЧ, функционально присоединяют к промотору, что означает, что нуклеиновая кислота находится под контролем промотора. Промотор может быть гомологичным промотором (то есть,

происходящим от того же генетического источника, что и вектор) или гетерологичным промотором (то есть, происходящим от другого вектора или генетического источника). Неограничивающие примеры подходящих промоторов для аденовирусных векторов включают промотор цитомегаловируса (CMV) и промотор вируса саркомы Рауса (RSV). Предпочтительно, промотор расположен выше нуклеиновой кислоты в экспрессионном кластере. Репрезентативная промоторная последовательность CMV, которая может быть функционально присоединена к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей синтетический белок оболочки ВИЧ, показана в SEQ ID NO: 24.

[0070] Неограничивающими примерами подходящих промоторов для поксвирусных векторов являются промотор 30K, промотор I3, промотор PrS, промотор PrS5E, Pr7.5K, длинный промотор Pr13.5, промотор PrHyb, промотор 40K, промотор MVA-40K, промотор FPV 40K, промотор 30k, промотор PrSynIIm и промотор PrLE1. Дополнительные промоторы также описаны в WO 2010/060632, WO 2010/102822, WO 2013/189611 и WO 2014/063832, которые в полном объеме включены в настоящее описание посредством ссылки. В более предпочтительных вариантах осуществления изобретения, антигены ВИЧ, если они были включены как часть поксвирусного вектора согласно изобретению, функционально присоединены к длинному промотору Pr13.5 (SEQ ID NO: 42) и/или к промотору PrHyb (SEQ ID NO: 43).

[0071] В соответствии с вариантами осуществления изобретения, вектор может представлять собой экспрессионный вектор. Экспрессионными векторами являются, но не ограничиваются ими, векторы для экспрессии рекомбинантного белка и векторы для доставки нуклеиновой кислоты пациенту для экспрессии в ткани пациента, такие как вирусный вектор. Примерами вирусных векторов, подходящих для использования в настоящем изобретении, являются, но не ограничиваются ими, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы, поксвирусные векторы, векторы MVA, векторы кишечного вируса, векторы вируса венесуэльского лошадиного энцефалита, векторы вируса лесов Семлики, векторы вируса табачной мозаики, лентивирусные векторы и т.п. Вектор может также представлять собой невирусный вектор. Примерами невирусных векторов являются, но не ограничиваются ими, плазмиды, бактериальные искусственные хромосомы, дрожжевые искусственные хромосомы, бактериофаги и т.п.

[0072] В некоторых вариантах осуществления изобретения, вектор представляет собой аденовирусный вектор. Аденовирус согласно изобретению принадлежит к семейству Adenoviridae, а предпочтительно к роду Mastadenovirus. Таким вирусом может быть человеческий аденовирус, а также аденовирус, который инфицирует другие виды, включая, но не ограничиваясь этим, бычий аденовирус (например, бычий аденовирус 3, BAdV3), аденовирус собак (например, CAdV2), аденовирус свиней (например, PAdV3 или 5) или аденовирус обезьян (который включает обезьяний аденовирус и аденовирус человекообразных обезьян, такой как аденовирус шимпанзе или аденовирус гориллы). Предпочтительно, аденовирус представляет собой человеческий аденовирус (HAdV или AdHu) или аденовирус обезьян, такой как аденовирус шимпанзе или гориллы (ChAd,

AdCh или SAdV) или аденовирус макака-резуса (RhAd). В настоящем изобретении, под человеческим аденовирусом подразумевается Ad без указания вида, например, сокращенное обозначение «Ad26» означает то же самое, что и HAdV26, который представляет собой человеческий аденовирус серотипа 26. Используемое здесь обозначение «rAd» означает рекомбинантный аденовирус, например, «rAd26» означает рекомбинантный человеческий аденовирус 26.

[0073] Большинство перспективных исследований было осуществлено с использованием человеческих аденовирусов, и в соответствии с некоторыми аспектами изобретения, человеческие аденовирусы являются предпочтительными. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения, рекомбинантный аденовирус согласно изобретению основан на человеческом аденовирусе. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, рекомбинантный аденовирус основан на человеческом аденовирусе серотипа 5, 11, 26, 34, 35, 48, 49, 50, 52 и т.п. В соответствии с особенно предпочтительным вариантом осуществления изобретения, аденовирус представляет собой человеческий аденовирус серотипа 26. Преимущества этих серотипов включают низкую серологическую реактивность и/или низкие уже существующие у людей титры нейтрализующих антител и опыт применения таких серотипов в клинических испытаниях с участием человека.

[0074] Аденовирусы обезьян обычно также имеют низкую серологическую реактивность и/или низкие уже существующие титры нейтрализующих антител у людей, и имеются сообщения о значительном объеме работ с использованием векторов аденовирусов шимпанзе (например, US 6083716; WO 2005/071093; WO 2010/086189; WO 2010085984; Farina и др., 2001, J Virol 75: 11603-13; Cohen и др., 2002, J Gen Virol 83: 151-55; Kobinger et al., 2006, Virology 346: 394-401; Tatsis et al. al., 2007, Molecular Therapy 15: 608-17; см. также обзор Bangari and Mittal, 2006, Vaccine 24: 849-62; и обзор Lasaro and Ertl, 2009, Mol Ther 17: 1333-39). Следовательно, в других вариантах осуществления изобретения, рекомбинантный аденовирус согласно изобретению основан на аденовирусе обезьян, например, аденовирусе шимпанзе. В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантный аденовирус основан на аденовирусе обезьян типа 1, 7, 8, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27.1, 28.1, 29, 30, 31.1, 32, 33, 34, 35.1, 36, 37.2, 39, 40.1, 41.1, 42.1, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50 или SA7P.

[0075] Предпочтительно, аденовирусный вектор представляет собой дефектный по репликации рекомбинантный вирусный вектор, такой как rAd26, rAd35, rAd48, rAd5HVR48 и т.д.

[0076] В предпочтительном варианте осуществления изобретения, аденовирусные векторы содержат капсидные белки редких серотипов, включая Ad26. В типичном варианте осуществления изобретения, вектор представляет собой вирус rAd26. «Капсидный белок аденовируса» означает белок на капсиде аденовируса (например, векторов Ad26, Ad35, rAd48, rAd5HVR48), который участвует в определении серотипа и/или тропизма конкретного аденовируса. Капсидные белки аденовируса обычно

включают белки волокна, пентона и/или гексона. Термин «капсидный белок», используемый здесь в отношении конкретного аденовируса, такой как «капсидный белок Ad26», может представлять собой, например, химерный капсидный белок, который включает по меньшей мере часть капсидного белка Ad26. В некоторых вариантах осуществления изобретения, капсидный белок представляет собой полноразмерный капсидный белок Ad26. В некоторых вариантах осуществления изобретения, гексон, пентон и волокно состоят из Ad26.

[0077] Специалисту в данной области очевидно, что элементы, полученные из множества серотипов, могут быть объединены в один рекомбинантный аденовирусный вектор. Таким образом, может быть получен химерный аденовирус, который объединяет в себе желательные свойства различных серотипов. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изобретения, химерный аденовирус согласно изобретению может сочетать в себе отсутствие ранее существовавшей способности вырабатывать иммунитет к первому серотипу и такие свойства, как термостабильность, сборка, заякоривание, выход продукта, перенацеленное или усиленное инфицирование, стабильность ДНК в клетке-мишени и т.п.

[0078] В некоторых вариантах осуществления изобретения, рекомбинантный аденовирусный вектор, используемый в настоящем изобретении, происходит, в основном или полностью, от Ad26 (то есть, этот вектор представляет собой rAd26). В некоторых вариантах осуществления изобретения, аденовирус является дефектным по репликации, например, потому, что он содержит делецию в области E1 генома. Для аденовирусов, происходящих от аденовируса, не принадлежащего к группе C, такого как Ad26 или Ad35, типичной является замена кодирующей последовательности E4-orf6 аденовируса на E4-orf6 человеческого аденовируса подгруппы C, такого как Ad5. Это позволяет размножить такие аденовирусы в хорошо известных соответствующих клеточных линиях, экспрессирующих гены E1 Ad5, таких как, например, клетки 293, клетки PER.C6 и т.п. (см., например, Havenga, et al., 2006, J Gen Virol 87: 2135-43; WO 03/104467). Однако, такие аденовирусы не могут реплицироваться в несоответствующих клетках, которые не экспрессируют гены E1 Ad5.

[0079] Получение рекомбинантных аденовирусных векторов хорошо известно специалистам в данной области. Получение векторов rAd26 описано, например, в WO 2007/104792 и в публикации Abbink et al. (2007) Virol 81 (9): 4654-63. Типичные последовательности генома Ad26 имеются в базе данных GenBank рег. № EF 153474 и в SEQ ID NO: 1 в WO 2007/104792. Примерами векторов, используемых в настоящем изобретении, являются, например, векторы, описанные в заявке WO2012/082918, раскрытие которой в полном объеме включено в настоящее описание посредством ссылки.

[0080] Обычно, вектор, используемый в настоящем изобретении, получают с использованием нуклеиновой кислоты, содержащей полноразмерный рекомбинантный аденовирусный геном (например, плазмидный, космидный или бакуловирусный вектор). Таким образом, настоящее изобретение также относится к выделенным молекулам

нуклеиновой кислоты, которые кодируют аденовирусные векторы согласно изобретению. Молекулы нуклеиновых кислот согласно изобретению могут быть представлены в форме РНК или в форме ДНК, полученной путем клонирования или путем синтеза. ДНК может быть двухцепочечной или одноцепочечной.

[0081] Аденовирусные векторы, используемые в настоящем изобретении, обычно являются дефектными по репликации. В этих вариантах осуществления изобретения, вирус становится дефектным по репликации в результате делеции или инактивации областей, играющих важную роль в репликации вируса, таких как область E1. Эти области могут быть, по существу, deletированы или инактивированы, например, путем вставки представляющего интерес гена, такого как ген, кодирующий синтетический белок оболочки ВИЧ (обычно связанный с промотором), или ген, кодирующий антигенный полипептид ВИЧ (обычно связанный с промотором) в данной области. В некоторых вариантах осуществления изобретения, векторы согласно изобретению могут содержать делеции в других областях, таких как области E2, E3 или E4, или вставки гетерологичных генов, связанных с промотором, в одной или более из этих областей. В случае E2- и/или E4-мутированных аденовирусов, для получения рекомбинантных аденовирусов обычно используют E2- и/или E4-комплементирующие клеточные линии. Мутации в области E3 аденовируса не должны комплементироваться клеточной линией, поскольку E3 не требуется для репликации.

[0082] Упаковывающую клеточную линию обычно используют для получения достаточного количества аденовирусных векторов, используемых в настоящем изобретении. Упаковывающая клетка представляет собой клетку, содержащую гены, которые были deletированы или инактивированы в векторе, дефектном по репликации, что позволяет вирусу реплицироваться в клетке. Подходящими упаковывающими клеточными линиями для аденовирусов с делецией в области E1 являются, например, PER.C6, 911, 293 и E1 A549.

[0083] В предпочтительном варианте осуществления изобретения, вектор представляет собой аденовирусный вектор, более предпочтительно, вектор rAd26, а наиболее предпочтительно, вектор rAd26 по меньшей мере с делецией в области E1 аденовирусного генома, например, такой как вектор, описанный в публикации Abbink, J Virol, 2007. 81(9): p. 4654-63, которая включена в настоящее описание посредством ссылки. Обычно, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую синтетический белок оболочки ВИЧ и/или другие антигены ВИЧ, клонируют в область E1 и/или E3 аденовирусного генома.

[0084] В предпочтительном аспекте изобретения, описанный здесь вектор, кодирующий синтетический антиген ВИЧ, представляет собой поксвирусный вектор. В особенно предпочтительном аспекте изобретения, вектор представляет собой вектор модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA). В дополнительных предпочтительных вариантах осуществления изобретения, вектор вируса MVA представляет собой MVA-BN или его производные.



[0085] MVA был получен путем более, чем 570 серийных пассажей поражающего кожу штамма осповакцины Анкара на фибробластах куриных эмбрионов (хориоаллантоисного вируса осповакцины Анкара, CVA; для сведения см., Maug et al. (1975) *Infection* 3, 6-14), который хранится в Институте вакцинации в Анкаре, Турция, на протяжении многих лет и используется в качестве основы для вакцинации людей. Атенюированный CVA-вирус MVA (модифицированный вирус осповакцины Анкара) получали путем серийного размножения (более 570 пассажей) CVA на первичных фибробластах куриных эмбрионов (CEF).

[0086] Однако, из-за частых тяжелых осложнений после вакцинации, связанных с вирусами осповакцины, было предпринято несколько попыток создать более аттенюированную и более безопасную вакцину. В результате пассирования, используемого для аттенюации MVA, был создан ряд различных штаммов или изолятов, в зависимости от числа пассажей, проводимых на клетках CEF. Штаммы MVA, имеющие улучшенные профили безопасности и используемые для получения более безопасных продуктов, таких как вакцины или фармацевтические препараты, были разработаны, например, специалистами Bavarian Nordic. Затем MVA был пассирован специалистами Bavarian Nordic и обозначен как MVA-BN. Репрезентативный образец MVA-BN был депонирован 30 августа 2000 года в Европейской Коллекции Клеточных Культур (ECACC) под номером доступа V00083008. MVA-BN дополнительно описан в WO 02/42480 (см. также, например, патенты США № 6761893 и 6913752 и US 2003/0206926) и WO 03/048184 (US 2006/0159699), которые включены в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. MVA, а также MVA-BN не содержат приблизительно 15% (31 т.п.о. из шести областей) генома по сравнению с природным вирусом CVA. Эти делеции влияют на ряд генов вирулентности и генов определенного круга хозяев, а также на ген телец включения типа А.

[0087] В различных вариантах осуществления изобретения, MVA или MVA, используемые для создания рекомбинантов, подходящих для настоящего изобретения, представляют собой MVA-572, MVA-575, MVA-I721, MVA, депонированные как ATCC® VR-1508™; MVA, депонированные как ATCC® VR-1566™, ACAM3000 MVA, MVA-BN или любые аналогичным образом аттенюированные штаммы MVA. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, MVA, используемый для получения рекомбинантов, представляют собой MVA-575; MVA, депонированный как ATCC® VR-1508™; MVA, депонированный как ATCC® VR-1566™; ACAM3000 MVA и MVA-BN. Для получения рекомбинантов, более предпочтительно, чтобы MVA представлял собой MVA-BN.

[0088] MVA-572 был депонирован в Европейской Коллекции Клеточных Культур животных (ECACC, Vaccine Research and Production Laboratory, Public Health Laboratory Service, Centre for Applied Microbiology and Research, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, United Kingdom), под депозитарным номером ECACC V94012707 27 января 1994 года. MVA-575 был депонирован под ECACC V00120707 7 декабря 2000 года. Acam3000

MVA был депонирован в Американской Коллекции Типовых Культур (ATCC) под регистрационным номером: PTA-5095 27 марта, 2003 (American Type Culture Collection, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA). MVA-I721 был депонирован как CNCM I721 в Национальной Коллекции Культур Микроорганизмов Института Пастера. MVA-BN был депонирован 30 августа 2000 года в ECACC под номером V00083008. MVA-BN был описан в WO 02/042480.

[0089] Настоящее изобретение также охватывает производные или варианты любого из описанных здесь вирусов MVA или MVA-BN. «Производные» или «варианты» MVA или MVA-BN относятся к вирусам MVA или MVA-BN, обладающим, по существу, такой же способностью к репликации, как и MVA или MVA-BN, к которым они относятся, но имеющим различия в одной или более частях геномов. Вирусы, имеющие такую же «способность к репликации», как и депонированный вирус, представляют собой вирусы, которые реплицируются с такими же коэффициентами амплификации, как и депонированный штамм в клетках CEF и клеточных линиях HaCat (Boukamp et al. (1988), J Cell Biol 106: 761-771), в клеточной линии остеосаркомы кости человека 143B (ECACC № 91112502), в клеточной линии почек эмбриона человека 293 (ECACC № 85120602) и в клеточной линии аденокарциномы шейки матки человека HeLa (ATCC № CCL-2). Тесты и анализ для определения этих свойств MVA, его производных и вариантов, такой как анализ на проницаемость клеточных линий, описанный в WO 02/42480, хорошо известны специалистам в данной области. В репрезентативном анализе на проницаемость клеточных линий, клеточные линии млекопитающих инфицируют родительским вирусом MVA и его производным или вариантом при низкой множественности заражения на клетку, то есть, 0,05 инфекционных единиц на клетку ( $5 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub>). После абсорбции в течение 1 часа, инокулят вируса удаляют и клетки три раза промывают для удаления любых оставшихся неабсорбированных вирусов. Затем добавляют свежую среду, в которую было добавлено 3% FCS, и оставляют для инфицирования всего на 4 дня (при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>), после чего могут быть приготовлены вирусные экстракты. Инфицирование прекращают путем трехкратного замораживания планшетов при -80°C. Затем определяют уровень множественности заражения вирусом и цитопатические эффекты (CPE) на клетках CEF с применением методов, хорошо известных специалистам, таких как методы, описанные Carroll and Moss (1997), Virology 238, 198-211.

[0090] Более конкретно, MVA-BN или его производное или вариант предпочтительно обладают способностью к репродуктивной репликации в фибробластах куриных эмбрионов (CEF), но не обладают способностью к репродуктивной репликации в клеточной линии кератиноцитов человека HaCat (Boukamp et al. (1988), J. Cell Biol. 106: 761-771), в клеточной линии остеосаркомы кости человека 143B (ECACC, депозит № 91112502), в клеточной линии почек эмбриона человека 293 (ECACC, депозит № 85120602) и в клеточной линии аденокарциномы шейки матки человека HeLa (ATCC, депозит № CCL-2). Кроме того, производное или вариант MVA-BN имеет коэффициент амплификации вируса по меньшей мере в два раза меньше, а более предпочтительно, в

три раза меньше, чем MVA-575 в клетках HeLa и в клеточных линиях HaCaT. Тесты и анализы для определения этих свойств вариантов MVA описаны в WO 02/42480 или в репрезентативном анализе на проницаемость клеточных линий, описанном выше.

[0091] Термин «не способен к репродуктивной репликации» или «не обладающий способностью к репродуктивной репликации» описан, например, в заявке WO 02/42480, в которой также описан способ получения MVA, обладающего желаемыми свойствами, упомянутыми выше. Этот термин применяется к вирусу, который имеет коэффициент амплификации вируса менее, чем 1, через 4 дня после инфицирования, как было определено с помощью анализов, описанных в WO 02/42480 или в патенте США № 6761893.

[0092] Термин «не способный к репродуктивной репликации» относится к вирусу, который имеет коэффициент амплификации менее, чем 1, через 4 дня после инфицирования. Анализы, описанные в WO 02/42480 или в патенте США № 6761893, могут быть применены для определения коэффициента амплификации вируса.

[0093] Амплификацию или репликацию вируса обычно выражают как отношение вируса, продуцируемого из инфицированной клетки (выход), к количеству, первоначально используемому для заражения клетки, на начальном этапе (вход), и это отношение называется «коэффициентом амплификации». Коэффициент амплификации «1» определяет уровень амплификации, если количество вируса, продуцируемого из инфицированных клеток, равно количеству вируса, первоначально используемому для инфицирования клеток, а это, в свою очередь, означает, что инфицированные клетки являются подходящими для инфицирования вирусом и его репродукции. И напротив, коэффициент амплификации менее 1, то есть, снижение уровня на выходе по сравнению с уровнем на входе, указывает на отсутствие репродуктивной репликации, а следовательно, и на аттенюирование вируса.

[0094] Представленные здесь рекомбинантные поксвирусные векторы могут быть получены рутинными методами, известными специалистам в данной области. Методы получения рекомбинантных поксвирусов или методы встраивания экзогенных кодирующих последовательностей в поксвирусный геном хорошо известны специалистам в данной области. Так, например, стандартные методы молекулярной биологии, такие как клонирование ДНК, выделение ДНК и РНК, вестерн-блот-анализ, методы ОТ-ПЦР и ПЦР-амплификации, описаны в руководстве *Molecular Cloning, A laboratory Manual (2nd Ed.)* [J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)], а методы обработки и модификации вирусов описаны в руководстве *Virology Methods Manual* [B.W.J. Mahy et al. (eds.), Academic Press (1996)]. Аналогичным образом, методы и ноу-хау для обработки, манипуляции и генной инженерии MVA описаны в руководстве *Molecular Virology: A Practical Approach* [A.J. Davison & R.M. Elliott (Eds.), The Practical Approach Series, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK (1993)(см., например, Главу 9: Expression of genes by Vaccinia virus vectors)] and *Current Protocols in Molecular Biology* [John Wiley & Son, Inc. (1998)(см., например, Главу 16, Раздел IV: Expression of proteins in mammalian

cells using vaccinia viral vector)].

[0095] Для получения различных описанных здесь рекомбинантных поксвирусов могут быть применены различные методы. Последовательность ДНК, которая должна быть встроена в вирус, может быть помещена в плазмидную конструкцию *E.coli*, в которую была встроена ДНК, гомологичная участку ДНК поксвируса. Отдельно встраиваемая последовательность ДНК может быть лигирована с промотором. Связь «промотор-ген» может быть расположена в плазмидной конструкции так, чтобы эта связь промотор-ген фланкировалась на обоих концах последовательностью ДНК, гомологичной последовательности ДНК, фланкирующей область поксвирусной ДНК, содержащей неосновной локус. Полученная плазмидная конструкция может быть амплифицирована путем размножения в бактериях *E.coli* и выделена. Выделенная плазида, содержащая встраиваемую последовательность ДНК-гена, может быть перенесена в клеточную культуру, например, фибробластов куриных эмбрионов (CEF), одновременно с инфицированием культуры поксвирусом. Рекомбинация между гомологичной поксвирусной ДНК в плазмиде и вирусным геномом, соответственно, может генерировать поксвирус, модифицированный благодаря присутствию чужеродных последовательностей ДНК.

[0096] В соответствии с предпочтительным вариантом осуществления изобретения, клетки подходящей клеточной культуры, например, клетки CEF, могут быть инфицированы поксвирусом. Затем, инфицированная клетка может быть трансфицирована первым плазмидным вектором, содержащим чужеродный или гетерологичный ген или гены, такие как одна или более нуклеиновых кислот, кодирующих антиген ВИЧ и представленных в настоящем описании, предпочтительно под транскрипционным контролем элемента регуляции экспрессии поксвируса. Как объясняется выше, плазмидный вектор также содержит последовательности, способные направлять вставку экзогенной последовательности в выбранную часть поксвирусного генома. Плазмидный вектор также содержит, но необязательно, кластер, содержащий маркер и/или селективный ген, функционально присоединенные к поксвирусному промотору. Подходящими маркерными генами или селективными генами являются, например, гены, кодирующие белок, флуоресцирующий в зеленом диапазоне спектра;  $\beta$ -галактозидазу; неомизин-фосфорибозилтрансферазу или другие маркеры. Использование селективных или маркерных кластеров упрощает идентификацию и выделение полученного рекомбинантного поксвируса. Однако, рекомбинантный поксвирус также может быть идентифицирован с помощью ПЦР-технологии. Затем, еще одна клетка может быть инфицирована рекомбинантным поксвирусом, полученным, как описано выше, и трансфицирована вторым вектором, содержащим второй чужеродный или гетерологичный ген или гены. В этом случае, этот ген должен быть введен в другой сайт инсерции поксвирусного генома, и второй вектор также будет отличаться последовательностями, гомологичными поксвирусу и направляющими интеграцию второго чужеродного гена или генов в геном поксвируса. После гомологичной рекомбинации может быть выделен

рекомбинантный вирус, содержащий два или более чужеродных или гетерологичных гена. Для введения дополнительных чужеродных генов в рекомбинантный вирус, стадии инфицирования и трансфекции можно повторять с использованием рекомбинантного вируса, выделенного на предыдущих стадиях заражения, и с использованием дополнительного вектора, содержащего дополнительный чужеродный ген или гены для трансфекции.

[0097] Альтернативно, стадии инфицирования и трансфекции, описанные выше, являются взаимозаменяемыми, то есть, подходящая клетка может быть сначала трансфицирована плазмидным вектором, содержащим чужеродный ген, а затем инфицирована поксвирусом. В качестве дополнительной альтернативы можно также ввести каждый чужеродный ген в различные вирусы, ко-инфицировать клетку всеми полученными рекомбинантными вирусами и провести скрининг на рекомбинант, включая все чужеродные гены. Третьей альтернативой является лигирование генома ДНК и чужеродных последовательностей *in vitro* и восстановление рекомбинантного генома ДНК вируса осповакцины с использованием вируса-помощника. Четвертой альтернативой является гомологичная рекомбинация в *E.coli* или в других бактериях между геномом поксвируса, клонированным в виде бактериальной искусственной хромосомы (BAC), и линейной чужеродной последовательностью, фланкированной последовательностями ДНК, гомологичными последовательностям, фланкирующим желаемый сайт интеграции в геноме вируса осповакцины.

[0098] Одна или более последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих по меньшей мере один антиген ВИЧ согласно вариантам осуществления изобретения могут быть встроены в любую подходящую часть поксвируса или поксвирусного вектора. В предпочтительном аспекте, поксвирус, используемый в настоящем изобретении, включает вирус MVA. Подходящие части вируса MVA, в которые может быть встроены одна или более нуклеиновых кислот согласно изобретению, включают не-основные части вируса MVA.

[0099] Для вируса MVA, не-основные части генома MVA могут представлять собой межгенные области или известные сайты делеции 1-6 генома MVA. Альтернативно или дополнительно, не-основные части рекомбинантного MVA могут представлять собой кодирующую область генома MVA, которая не является обязательной для размножения вируса. Однако, сайты инсерции не ограничены этими предпочтительными сайтами инсерции в геноме MVA, поскольку в объем настоящего изобретения входят описанные здесь антигены и нуклеиновые кислоты и любые сопутствующие промоторы, которые могут быть встроены в любой сайт вирусного генома, при условии, что могут быть получены рекомбинанты, которые могут быть амплифицированы и размножены по меньшей мере в одной системе культивирования клеток, такой как фибробласты куриных эмбрионов (клетки CEF).

[0100] Предпочтительно, нуклеиновые кислоты согласно изобретению встраивают в одну или более межгенных областей (IGR) MVA. Термины «межгенная область» и

«IGR» предпочтительно означают части вирусного генома, которые расположены между двумя смежными открытыми рамками считывания (ОРС) генома MVA, предпочтительно между двумя основными ОРС генома вируса MVA. В некоторых вариантах осуществления изобретения, для MVA, IGR выбран из IGR 07/08, IGR 44/45, IGR 64/65, IGR 88/89, IGR 136/137 и IGR 148/149. В более предпочтительных вариантах осуществления изобретения, нуклеиновые кислоты согласно изобретению встроены в области IGR 44/45 и IGR 88/89.

[0101] В соответствии с вариантами осуществления изобретения, и как указывалось выше, любой из описанных здесь синтетических белков оболочки ВИЧ и/или антигенов ВИЧ могут экспрессироваться в векторах согласно изобретению. Специалисту в данной области хорошо известно, что из-за вырожденности генетического кода, могут быть сконструированы несколько последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют один и тот же белок, в соответствии с общими рутинными способами. Нуклеиновая кислота, кодирующая синтетический белок оболочки ВИЧ и/или антигены ВИЧ, может быть, но необязательно, оптимизирована по кодонам для обеспечения «правильной» экспрессии у хозяина, подвергаемого лечению (например, у человека). Оптимизация по кодонам представляет собой технологию, широко применяемую в данной области. Некоторые неограничивающие примеры последовательностей, кодирующих синтетический белок оболочки ВИЧ согласно изобретению, представлены в SEQ ID NO: 26 (используемые в аденовирусных векторах в Примерах) и 41 (используемые в векторах MVA в Примерах); и некоторые неограничивающие примеры последовательностей, кодирующих дополнительные антигены ВИЧ для использования в настоящем изобретении, представлены в SEQ ID NO: 20-22 (используемые в аденовирусных векторах в Примерах) и 38-40 (используемые в векторах MVA в Примерах).

[0102] Настоящее изобретение также относится к клеткам, а предпочтительно к выделенным клеткам, содержащим любой из векторов, описанных в настоящей заявке. Клетки могут быть использованы для продуцирования рекомбинантного белка или для продуцирования вирусных частиц.

[0103] В настоящем изобретении также раскрывается способ получения синтетического антигенного полипептида ВИЧ. Этот способ включает трансфекцию клетки-хозяина экспрессионным вектором, включающим нуклеиновую кислоту, кодирующую синтетический антигенный полипептид ВИЧ, функционально присоединенный к промотору; культивирование трансфицированной клетки в условиях, подходящих для экспрессии синтетического антигенного полипептида ВИЧ, и выделение синтетического антигенного полипептида ВИЧ из клетки. Синтетический антигенный полипептид ВИЧ может быть выделен или собран из клетки любым способом, известным специалистам в данной области, включая аффинную хроматографию и т.п. Методы, используемые для экспрессии рекомбинантного белка, хорошо известны специалистам в данной области и применены исходя из раскрытия настоящего изобретения.

[0104] Настоящее изобретение также относится к способу получения вектора,

кодирующего синтетический антигенный полипептид ВИЧ согласно изобретению, где указанный способ включает культивирование клетки, содержащей вектор, для размножения и амплификации вектора во время указанного культивирования, и выделение вектора, кодирующего синтетический антигенный полипептид ВИЧ согласно изобретению, из клеточной культуры, например из клеток, из культуральной среды или того и другого. Вектор может быть дополнительно очищен в соответствии со способами, известными специалистам в данной области.

[0105] В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к поксвирусному вектору, а предпочтительно к вектору MVA, такому как вектор MVA-BN, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую синтетический антиген ВИЧ. Поксвирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую синтетический антиген оболочки ВИЧ (Env) согласно изобретению, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и, необязательно, также последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую по меньшей мере один дополнительный антиген ВИЧ. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, поксвирусный вектор, а более предпочтительно, вектор MVA содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый антиген Env ВИЧ, который представляет собой синтетический антиген Env ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и по меньшей мере один дополнительный антиген ВИЧ, такой как антигены Gag, Pol и/или Env, а предпочтительно один или более дополнительных антигенов ВИЧ, содержащих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-5, 28 и 29.

[0106] Так, например, в конкретном варианте осуществления изобретения, поксвирусный вектор может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую первый антиген Env ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; второй антиген Env ВИЧ, отличающийся от первого антигена Env ВИЧ; третий антиген и четвертый антиген, которые представляют собой два различных антигена Gag ВИЧ; и пятый антиген и шестой антиген, которые представляют собой два различных антигена Pol ВИЧ. Антигены Gag и Pol могут быть объединены в первый гибридный антиген Gag-Pol и второй гибридный антиген Gag-Pol, такие как гибридные антигены Gag-Pol, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 29.

[0107] В некоторых репрезентативных вариантах осуществления изобретения, поксвирусный вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую одну или более аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-5, 18, 28 и 29. В одном или более конкретных вариантах осуществления изобретения, поксвирусный вектор содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-5 и 18, а более предпочтительно SEQ ID NO: 5, 18, 28 и 29.

[0108] В некоторых других репрезентативных вариантах осуществления изобретения, вектор представляет собой аденовирусный вектор, содержащий

последовательность нуклеиновой кислоты, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 25, 26 и 27, а предпочтительно SEQ ID NO: 26. Дополнительные репрезентативные примеры включают аденовирусные векторы, кодирующие другие антигены ВИЧ, такие аденовирусные векторы, содержащие одну или более последовательностей нуклеиновых кислот, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 20, 21 и 22. В некоторых других вариантах осуществления изобретения, вектор представляет собой поксвирусный вектор, предпочтительно вектор MVA, а более предпочтительно, MVA-BN, где указанный вектор содержит одну или несколько последовательностей нуклеиновых кислот, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 38, 39, 40 и 41. В одном или более конкретных вариантах осуществления изобретения, поксвирусный вектор содержит SEQ ID NO: 38, 39, 40 и 41.

[0109] Последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая один или более антигенов ВИЧ, может быть встроена в любой соответствующий сайт инсерции генома поксвирусного вектора, как описано в настоящей заявке. В конкретных вариантах осуществления изобретения, где поксвирусный вектор представляет собой вектор MVA, такой как MVA-BN или его производные, кодирующие один или более гибридных антигенов Gag-Pol, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая первый гибридный антиген Gag-Pol, может быть встроена в межгенную область (IGR) 44/45 генома MVA, а последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующая второй гибридный антиген Gag-Pol, может быть встроена в IGR 88/89 генома MVA. Кроме того, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующая антигены Env ВИЧ, может быть встроена в IGR 44/45 и/или IGR 88/89 генома MVA. В одном или более конкретных вариантах осуществления изобретения, поксвирусный вектор содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный антиген Gag-Pol, содержащий SEQ ID NO: 28, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген Env ВИЧ, содержащий SEQ ID NO: 5, встраивают в IGR 44/45 генома MVA и/или последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую гибридный антиген Gag-Pol, содержащий SEQ ID NO: 29, и последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антиген Env ВИЧ, содержащий SEQ ID NO: 18, встраивают в IGR 88/89 генома MVA. Предпочтительно, чтобы каждый их гибридных антигенов Gag-Pol находился под контролем отдельного промотора, предпочтительно, промотора Pr13.5, такого как промотор, представленный в SEQ ID NO: 42, и/или чтобы каждый из антигенов Env находился под контролем отдельного промотора, предпочтительно, промотора PrHub, такого как промотор, представленный в SEQ ID NO: 43.

#### [0110] Композиции

[0111] В другом своем общем аспекте, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей вектор, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую синтетический белок оболочки ВИЧ, и носитель. Предпочтительно, композиция представляет собой вакцинную композицию, которая более подробно описана ниже. Согласно вариантам осуществления изобретения, в композицию может быть включен



любой из описанных здесь векторов. Предпочтительно, вектор представляет собой вирусный вектор, более предпочтительно аденовирусный вектор или поксвирусный вектор, а еще более предпочтительно, вектор аденовируса 26 или вектор MVA.

[0112] В одном варианте осуществления изобретения, композиция согласно изобретению включает поксвирусный вектор, предпочтительно вектор MVA, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую синтетический белок оболочки ВИЧ, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 18, или SEQ ID NO: 19, а более предпочтительно аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения, вектор представляет собой вектор MVA-BN или его производное. В одном или более конкретных вариантах осуществления изобретения, композиция согласно изобретению включает поксвирусный вектор, вектор MVA или вектор MVA-BN, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую по меньшей мере первый антиген оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. Наиболее предпочтительно, такой вектор дополнительно содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую: (b) второй антиген Env ВИЧ, отличающийся от первого антигена Env ВИЧ; (c) третий антиген и четвертый антиген, которые представляют собой два различных антигена Gag ВИЧ; и (d) пятый антиген и шестой антиген, которые представляют собой два различных антигена Pol ВИЧ. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, второй антиген Env ВИЧ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, третий и четвертый антигены содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 соответственно; а пятый и шестой антигены содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4 соответственно. В некоторых вариантах осуществления изобретения, третий и пятый антигены вместе образуют первый гибридный антиген Gag-Pol, который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, а четвертый и шестой антигены вместе образуют второй гибридный антиген Gag-Pol который содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

[0113] В соответствии с вариантами осуществления изобретения, композиция, содержащая поксвирусный вектор согласно изобретению, может быть использована вместе с одним или более дополнительными векторами, кодирующими один или более дополнительных антигенов ВИЧ, и/или один или более отдельных антигенных полипептидов ВИЧ. Дополнительные векторы и/или антигенные полипептиды ВИЧ могут присутствовать в одной и той же композиции или в одной или более различных композициях. Предпочтительно, один или более дополнительных векторов представляют собой вирусные векторы, такие как аденовирусные векторы, более предпочтительно, векторы аденовируса 26 или поксвирусные векторы, а более предпочтительно векторы MVA. Один или более дополнительных векторов могут кодировать любой антиген ВИЧ, известный специалистам в данной области, в соответствии с раскрытием настоящего изобретения. Наиболее предпочтительно, один или более дополнительных векторов представляют собой аденовирусные векторы, а предпочтительно векторы аденовируса 26,

кодирующие один или более антигенов ВИЧ, содержащих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-5, 18, 28 и 29.

[0114] В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к комбинированной вакцине, содержащей один или более векторов, которые вместе включают последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие (a) синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; (b) второй белок оболочки ВИЧ, предпочтительно содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; (c) третий антиген и четвертый антиген, представляющие собой два различных антигена Gag ВИЧ, предпочтительно, содержащих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1 и 2, соответственно; и (d) пятый антиген и шестой антиген, представляющие собой два различных антигена Pol ВИЧ, предпочтительно включающие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 4, соответственно. В одном или более конкретных вариантах осуществления изобретения, третий и пятый антигены вместе образуют первый гибридный антиген Gag-Pol, предпочтительно, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, а четвертый и шестой антигены вместе образуют второй гибридный антиген Gag-Pol, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. Каждый из векторов может присутствовать в отдельных композициях, либо они могут быть объединены в одну композицию. Множество нуклеиновых кислот в векторе(ах) предназначены для введения одному пациенту, что будет приводить к выработыванию иммунного ответа на ВИЧ более широкого спектра, чем иммунный ответ, который был бы получен после введения любого отдельно взятого вектора. Множество последовательностей нуклеиновых кислот может также присутствовать в одном отдельном векторе.

[0115] В соответствии с вариантами осуществления изобретения, один или более векторов могут представлять собой аденовирусные векторы, предпочтительно, векторы аденовируса 26, и/или поксвирусные векторы, предпочтительно, векторы MVA. Композиции, содержащие аденовирусные и/или поксвирусные векторы, могут также содержать, но необязательно, один или более выделенных антигенных полипептидов ВИЧ. Любой выделенный антигенный полипептид ВИЧ может быть использован в композициях согласно изобретению в соответствии с раскрытием настоящего изобретения. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления изобретения, один или более выделенных антигенных полипептидов ВИЧ содержат полипептид, включающий остатки 30-708 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7; полипептид, включающий остатки 30-724 SEQ ID NO: 36, или их комбинацию.

[0116] В одном или более конкретных вариантах осуществления изобретения, комбинация включает аденовирусный вектор, предпочтительно, вектор аденовируса 26, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую один или более антигенов ВИЧ, предпочтительно выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-5, 18, 28 и 29, и поксвирусный вектор, предпочтительно вектор MVA, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую один или более антигенов ВИЧ, предпочтительно, выбранных из группы,

состоящей из SEQ ID NO: 1-5, 18, 28 и 29. Предпочтительно, один или более аденовирусных векторов, предпочтительно, векторов аденовируса 26, вместе кодируют SEQ ID NO: 1-5 и 18; а поксвирусный вектор, предпочтительно, вектор MVA, кодирует SEQ ID NO: 1-5 и 18. Векторы могут присутствовать в одной композиции или в одной или более различных композициях.

[0117] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, композиция, такая как вакцинная композиция, содержит иммуногенно эффективное количество вектора, такого как вирусный вектор. Используемый здесь термин «иммуногенно эффективное количество» или «иммунологически эффективное количество» означает количество композиции, достаточное для индукции желаемого иммунного эффекта или иммунного ответа у пациента. В одном варианте осуществления изобретения, иммуногенно эффективное количество означает количество, достаточное для индукции иммунного ответа у пациента. В другом варианте осуществления изобретения, иммуногенно эффективное количество означает количество, достаточное для выработки иммунитета у пациента, например, для выработки протективного эффекта против заболевания, такого как вирусная инфекция. Иммуногенно эффективное количество может варьироваться в зависимости от ряда факторов, таких как физическое состояние, возраст, масса, состояние здоровья пациента и т.п.; конкретное применение, будь то индуцирование иммунного ответа или выработка протективного иммунитета; вводимый специфический рекомбинантный вектор; иммуноген или антигенный полипептид, кодируемый введенным рекомбинантным вектором; вводимый специфический антигенный полипептид; и конкретное заболевание, например вирусная инфекция, против которой должен вырабатываться иммунитет. Иммуногенно эффективное количество может быть легко определено специалистом в данной области в соответствии с раскрытием настоящего изобретения.

{0118} В соответствии с общим руководством, иммуногенно эффективное количество, если оно используется для рекомбинантного вирусного вектора, такого как аденовирусный вектор, может составлять, например, приблизительно от  $10^8$  вирусных частиц и приблизительно до  $10^{12}$  вирусных частиц, например  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$ ,  $10^{11}$  или  $10^{12}$  вирусных частиц. Разовая доза аденовирусных векторов для введения человеку в некоторых вариантах осуществления изобретения составляет  $10^9$ - $10^{11}$  вирусных частиц. Иммуногенно эффективное количество, если оно используется для рекомбинантного вирусного вектора, такого как поксвирусный вектор, может составлять, например,  $10^4$ - $10^{11}$  TCID<sub>50</sub>,  $10^5$ - $10^{10}$  TCID<sub>50</sub>,  $10^6$ - $10^9$  TCID<sub>50</sub> или  $10^7$ - $10^8$  TCID<sub>50</sub>, а именно,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$  или  $10^{11}$  TCID<sub>50</sub>. Предпочтительная доза для пациентов (предпочтительно для человека) составляет  $10^5$ - $10^{10}$  TCID<sub>50</sub>, включая дозу  $10^5$  TCID<sub>50</sub>,  $10^6$  TCID<sub>50</sub>,  $10^7$  TCID<sub>50</sub>,  $10^8$  TCID<sub>50</sub>,  $10^9$  TCID<sub>50</sub> или  $10^{10}$  TCID<sub>50</sub>. Иммуногенно эффективное количество поксвирусного вектора, такого как вектор MVA, может быть альтернативно или традиционно выражено в бляшкообразующих единицах (БОЕ), и может, например, составлять приблизительно от  $10^5$  до приблизительно  $10^{11}$  БОЕ, например,

приблизительно  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ ,  $10^{10}$  или  $10^{11}$  БОЕ, предпочтительно, приблизительно  $10^7$ - $10^9$  БОЕ, а более предпочтительно, приблизительно  $10^8$  БОЕ, например, приблизительно  $0,5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $2 \times 10^8$ ,  $3 \times 10^8$ ,  $4 \times 10^8$  или  $5 \times 10^8$  БОЕ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, иммуногенно эффективное количество вектора MVA согласно изобретению, вводимое человеку, составляет приблизительно от  $1 \times 10^7$  до  $1 \times 10^9$  БОЕ, а предпочтительно, приблизительно  $1 \times 10^8$  БОЕ, предпочтительно в объеме от 0,1 мл до 1 мл, например, 0,5 мл.

[0119] Иммуногенно эффективное количество вектора, такого как вектор MVA и/или аденовирусный вектор, можно вводить в одной композиции или в нескольких композициях, таких как 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 композиций (например, таблеток, капсул или инъекций), где совместное введение множества капсул или инъекций обеспечивает пациенту иммуногенно эффективное количество. Пациенту также может быть введено иммуногенно эффективное количество, а затем может быть введена другая доза иммуногенно эффективного количества тому же пациенту по так называемой схеме «прайм-буст». Если это необходимо, то к этой схеме могут быть добавлены, но необязательно, дополнительные бустер-дозы. Эта общая концепция схемы «прайм-буст» хорошо известна специалистам в области вакцинации и более подробно описана ниже.

[0120] Композиции согласно изобретению могут также содержать носитель. Носитель может включать один или более фармацевтически приемлемых наполнителей, таких как связующие агенты, дезинтеграторы, агенты для набухания, суспендирующие агенты, эмульгирующие агенты, смачивающие агенты, лубриканты, ароматизаторы, подсластители, консерванты, красители, солюбилизаторы и реагенты для нанесения покрытий. Природа носителя или другого вещества может зависеть от способа введения, например, внутримышечного, подкожного, перорального, внутривенного и кожного введения, введения в слизистую (например, в кишечник), интраназального или внутрибрюшинного введения. Для жидких инъекционных препаратов, например, суспензий и растворов, подходящими носителями и добавками являются вода, гликоли, масла, спирты, консерванты, красители и т.п. Для твердых пероральных препаратов, например, порошков, капсул, небольших капсул, гелевых капсул и таблеток, подходящими носителями и добавками являются крахмалы, сахара, разбавители, гранулирующие агенты, лубриканты, связующие агенты, дезинтегрирующие агенты и т.п. Для смесей интраназальных спреев/ингаляций, водный раствор/суспензия может содержать воду, гликоли, масла, смягчители, стабилизаторы, смачивающие агенты, консерванты, ароматические вещества, ароматизаторы и т.п., подходящие для их использования в качестве носителей и добавок.

[0121] Композиции согласно изобретению могут быть приготовлены в любой форме, подходящей для введения пациенту в целях облегчения введения и повышения эффективности, включая, но не ограничиваясь ими, пероральное (энтеральное) введение и парентеральные инъекции. Парентеральные инъекции включают внутривенную инъекцию или инфузию, внутриартериальную инъекцию, подкожную инъекцию, внутримышечную

инъекцию и внутрисуставную инъекцию. Композиции согласно изобретению могут быть также приготовлены для других способов введения, включая введение через слизистую, внутриглазное введение, ректальное введение, имплантацию длительного действия, сублингвальное введение, введение под язык, введение через слизистую полости рта посредством искусственного кровообращения через воротную вену, ингаляцию или интраназальное введение.

[0122] В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения, композиция содержит иммуногенно эффективное количество очищенного или частично очищенного вектора, например, аденовирусного вектора, такого как вектор аденовируса 26; или поксвирусного вектора, такого как MVA или MVA-BN; вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую синтетический белок оболочки ВИЧ согласно изобретению, и необязательно один или более дополнительных антигенов ВИЧ. Указанные композиции могут быть приготовлены в виде вакцины (также называемой «иммуногенной композицией») методами, хорошо известными специалистам в данной области.

[0123] В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция может также содержать один или более полипептидов, включающих иммуногенно эффективное количество выделенного антигенного полипептида ВИЧ. Обычно, иммуногенно эффективное количество, если оно относится к полипептиду, такому как выделенный антигенный полипептид, может составлять в пределах, например, приблизительно от 0,3 до приблизительно 3000 микрограммов (мкг), например, 1-1000 мкг, например 10-500 мкг, например, приблизительно 50 или 250 мкг. В качестве неограничивающего примера, введение одного или более векторов, кодирующих синтетический антиген Env ВИЧ согласно изобретению (например, имеющих SEQ ID NO: 18), и необязательно одного или более дополнительных антигенов ВИЧ (например, имеющих SEQ ID NO: 1-5, 28 и/или 29) можно объединить с введением выделенного полипептида Env ВИЧ, например, 250 мкг белка тримера Env ВИЧ кладотипа С, имеющего аминокислоты 30-708 SEQ ID NO: 7, или 250 мкг мозаичного белка тримера Env ВИЧ, имеющего аминокислоты 30-708 SEQ ID NO: 36.

[0124] В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции согласно изобретению могут также включать, но необязательно, адъювант для усиления иммунных ответов. Используемые здесь термины «адъювант» и «иммуностимулятор» являются синонимами и определяются как одно или более веществ, стимулирующих иммунную систему. В этом контексте, адъювант используется для усиления иммунного ответа на векторы, кодирующие синтетические белки оболочки ВИЧ согласно изобретению, и, необязательно, один или более дополнительных антигенов ВИЧ и/или антигенных полипептидов ВИЧ, используемых в комбинации с векторами, кодирующими синтетические белки оболочки ВИЧ согласно изобретению и, необязательно, один или более дополнительных антигенов ВИЧ.

[0125] Адъюванты, подходящие для их использования согласно изобретению,

должны быть потенциально безопасными, хорошо переносимыми и эффективными для человека, и ими являются, например, QS-21, Detox-PC, MPL-SE, MoGM-CSF, TiterMax-G, CRL-1005, GERBU, TERamide, PSC97B, Adjuver, PG-026, GSK-I, GcMAF, В-алетин, MPC-026, Adjuvax, CpG ODN, бетафектин, соли алюминия (например, AdjuPhos), Adjuplex и MF59. Оптимальные соотношения каждого компонента в композиции могут быть определены методами, хорошо известными специалистам в данной области в соответствии с раскрытием настоящего изобретения.

[0126] В предпочтительном варианте осуществления изобретения, адъювант представляет собой соль алюминия, такую как фосфат алюминия, например AdjuPhos. В некоторых вариантах осуществления изобретения, фосфат алюминия предпочтительно присутствует или вводится в комбинации с выделенным антигенным полипептидом ВИЧ, таким как gp140.

[0127] Получение и применение иммуногенных композиций хорошо известны специалистам в данной области. Жидкие фармацевтические композиции обычно включают жидкий носитель, такой как вода, вазелиновое масло, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Также могут быть включены физиологический раствор, декстроза или другой раствор сахара или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль.

[0128] Так, например, рекомбинантный аденовирусный вектор может храниться в буфере, который также используется в соответствии с Международным стандартом для аденовирусов (Hoganson et al., 2002, Bioprocessing J. 1: 43-8): 20 mM Трис, pH 8, 25 mM NaCl, 2,5% глицерина. Другим подходящим буфером для приготовления аденовирусного препарата, подходящего для введения человеку, является 20 mM Трис, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM NaCl, 10% масс./об. сахарозы, 0,02% масс./об. полисорбата-80. Другой буфер для приготовления препарата рекомбинантного аденовируса включает 10-25 mM цитратного буфера, pH 5,9-6,2, 4-6% (масс./масс.) гидроксипропил-бета-циклодекстрина (HBCD), 70-100 mM NaCl, 0,018-0,035% (масс./масс.) полисорбата-80 и, необязательно, 0,3-0,45% (масс./масс.) этанола. Очевидно, что можно использовать множество других буферов, и известно несколько примеров подходящих составов для хранения и фармацевтического введения очищенных векторов.

[0129] Обычно, получение и хранение поксвирусов, включая MVA и MVA-BN, может основываться на опыте приготовления поксвирусных вакцин, используемых для вакцинации против натуральной оспы, как описано, например, Stickl, H. et al., Dtsch. med. Wschr. 99, 2386-2392 (1974).

[0130] В одном из примеров варианта осуществления изобретения, очищенный поксвирус хранят при -80°C с титром  $5 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>/мл, приготовленным в 10 mM Трис, 140 mM NaCl, pH 7,7. Для приготовления доз вакцины, например,  $10^2$ - $10^8$  частиц вируса могут быть лиофилизованы в фосфатно-буферном физиологическом растворе (PBS) в присутствии 2% пептона и 1% человеческого альбумина в ампуле, а предпочтительно, в стеклянной ампуле. Альтернативно, дозы вакцины могут быть получены путем

постадийной лиофилизации вируса в композиции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция содержит дополнительные добавки, такие как маннит, декстран, сахар, глицин, лактоза, поливинилпирролидон или другие добавки, включая, но не ограничиваясь ими, антиоксиданты или инертный газ, стабилизаторы или рекомбинантные белки (например, альбумин человеческой сыворотки), подходящие для введения *in vivo*. Затем ампулу герметично закрывают, и такая ампула может храниться при подходящей температуре, например, от 4°C до комнатной температуры, в течение нескольких месяцев. Однако, ампулу хранят, предпочтительно, при температуре ниже -20°C, до тех пор, пока в этом не будет необходимости.

[0131] В различных вариантах осуществления изобретения, включающих вакцинацию или терапию, лиофилизат растворяют в 0,1-0,5 мл водного раствора, предпочтительно, физиологического раствора или трис-буфера, и вводят системно или местно, то есть, парентерально, подкожно, внутривенно, внутримышечно, интраназально, интрадермально или любым другим способом введения, известны квалифицированному специалисту. Оптимизация способа введения, дозы и количества введений входит в компетенцию специалиста в данной области.

[0132] Преимущество вариантов осуществления изобретения, в которых вектор или комбинация векторов кодируют оба антигена ВИЧ, содержащих SEQ ID NO: 18 и 5, заключается в увеличении широты иммунного ответа (охватывающего штаммы кладотипов В и С).

[0133] В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция или вакцинная комбинация согласно изобретению также включает те же самые или другие векторы, и нуклеиновую кислоту кодирующую антигенный полипептид ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28 (mos1GagPol) и/или SEQ ID NO: 29 (mos2GagPol).

[0134] В конкретном варианте осуществления изобретения, композиция или вакцинная комбинация согласно изобретению содержит первый аденовирусный вектор, предпочтительно вектор аденовируса 26, кодирующий антиген ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и дополнительно содержит второй аденовирусный вектор, предпочтительно, вектор аденовируса 26, кодирующий антиген ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и один или более дополнительных аденовирусных векторов, предпочтительно, векторов аденовируса 26, кодирующие один или более антигенов ВИЧ, содержащих аминокислотную последовательность, выбранную из группы состоящий из SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 29. Так, например, композиция или вакцинная комбинация согласно варианту осуществления изобретения может содержать четыре аденовирусных вектора, предпочтительно векторы аденовируса 26, то есть, первый вектор, кодирующий синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; второй вектор, кодирующий антиген ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; третий вектор, кодирующий антиген ВИЧ,

содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; и четвертый вектор, кодирующий антиген ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. Предпочтительно, поксвирусный вектор согласно изобретению может быть частью вакцинной комбинации с этими аденовирусными векторами. Такой поксвирусный вектор, а предпочтительно, вектор MVA, например, вектор MVA-BN, в предпочтительном варианте осуществления изобретения, кодирует каждую из SEQ ID NO: 18, 5, 28 и 29.

[0135] В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения, композиция или вакцинная комбинация содержит поксвирусный вектор, предпочтительно вектор MVA, а предпочтительно, MVA-BN, включающий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую шесть различных антигенов ВИЧ, а именно, антигены, кодируемые SEQ ID NO: 18 (Mos2S Env), SEQ ID NO: 5 (mos1 Env), SEQ ID NO: 1 (mos1 Gag), SEQ ID NO: 2 (mos2 Gag), SEQ ID NO: 3 (mos1 Pol) и SEQ ID NO: 4 (mos2 Pol), где SEQ ID NO: 1 и 3 могут быть, но необязательно, связаны друг с другом (SEQ ID NO: 28; mos1GagPol), и SEQ ID NO: 2 и 4 могут быть, но необязательно, связаны друг с другом (SEQ ID NO: 29: mos2GagPol). Преимущество состоит в том, что для введения этих шести антигенов ВИЧ необходимо изготовить, очистить, определять состав, протестировать, хранить, доставлять и вводить только один вектор. Также известно, что поксвирусные векторы, такие как MVA, включая MVA-BN, обеспечивают хорошие иммунные ответы против кодируемых ими антигенов. Кроме того, обычно, они могут быть преимущественно использованы вместе с другими векторными основами, такими как, например, аденовирусные векторы Ad26, векторы в схемах прайм-буст для выработки еще более сильных иммунных ответов. Так, например, поксвирусный вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую шесть различных антигенов ВИЧ, кодируемых SEQ ID NO: 1-5 и 18, может быть использован вместе с одним или более аденовирусными векторами, предпочтительно, с векторами аденовируса 26, кодирующими один или более антигенов ВИЧ, кодируемых SEQ ID NO: 1-5 и 18, где, предпочтительно, один или более аденовирусных векторов вместе кодируют SEQ ID NO: 1-5 и 18.

[0136] Как было упомянуто выше, в некоторых вариантах осуществления изобретения, композиция или вакцинная комбинация также содержит один или более выделенных антигенных полипептидов ВИЧ. Любой антигенный полипептид ВИЧ, известный специалистам в данной области, в соответствии с раскрытием настоящего изобретения, может быть также включен в композицию или вакцинную комбинацию согласно изобретению, включая, но не ограничиваясь ими, белок оболочки ВИЧ (например, gp160, gp140, gp120 или gp41), предпочтительно, стабилизированный тримерный белок gp140, такой как стабилизированный белок gp140 кладотипа С или кладотипа А. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, выделенный антигенный полипептид ВИЧ представляет собой стабилизированный тримерный белок gp140 ВИЧ кладотипа С, такой как белок, содержащий остатки 30-708 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 (остатки 1-29 SEQ ID NO: 7 присутствуют в



сигнальной последовательности). Альтернативным или дополнительным полипептидом Env ВИЧ, который может быть использован в дополнение к белку gp140 кладотипа С или отдельно, является мозаичный тримерный белок Env, например, белок, имеющий аминокислотную последовательность, представленную аминокислотами 30-724 SEQ ID NO: 36 (что соответствует SEQ ID NO: 2 в WO 2014/107744, где остатки 1-29 SEQ ID NO: 36 находятся в сигнальной последовательности). В некоторых вариантах осуществления изобретения, антигенные полипептиды ВИЧ включают (i) белок gp140 кладотипа С, содержащий аминокислотные остатки 30-708 SEQ ID NO: 7, и (ii) мозаичный белок gp140, содержащий аминокислотные остатки 30-724 SEQ ID № 36.

[0137] Настоящее изобретение также относится к способу получения композиции или вакцинной комбинации согласно изобретению. Согласно вариантам осуществления изобретения, способ получения композиции или комбинации включает объединение вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую синтетический белок оболочки ВИЧ согласно изобретению, с носителем и, необязательно, одного или более дополнительных векторов, кодирующих один или более дополнительных антигенных полипептидов ВИЧ и/или один или более выделенных антигенных полипептидов ВИЧ. Специалистам в данной области известны традиционные методики, применяемые для приготовления таких композиций.

#### [0138] Вакцина и комбинации вакцин

[0139] Другие общие аспекты изобретения относятся к вакцинам и комбинациям вакцин. В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанные здесь композиции согласно изобретению являются вакцинами. Используемый здесь термин «вакцина» означает композицию, содержащую иммунологически эффективное количество экспрессионного вектора, предпочтительно вирусного вектора, кодирующего синтетический белок оболочки ВИЧ согласно изобретению, а также, но необязательно, кодирующего один или более дополнительных антигенов ВИЧ, которые могут быть использованы для выработки протективного иммунитета или протективного иммунного ответа у пациента или для вакцинации пациента. В соответствии с вариантами осуществления изобретения, после введения композиции пациенту, экспрессионный вектор экспрессирует кодируемый синтетический белок оболочки ВИЧ, а также, но необязательно, кодируемые антигены ВИЧ, и экспрессированный синтетический белок оболочки ВИЧ, а также, но необязательно, кодируемые антигены ВИЧ презентуются иммунной системе пациента, и тем самым, индуцируют нужный ответ для выработки иммунитета или индукции иммунного ответа.

[0140] Таким образом, в другом своем общем аспекте, настоящее изобретение относится к вакцине для индукции иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) у пациента. Согласно вариантам осуществления изобретения, вакцина включает композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество экспрессионного вектора, кодирующего синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. Предпочтительно, экспрессионным

вектором является вирусный вектор, более предпочтительно, аденовирусный вектор, например вектор аденовируса 26, а наиболее предпочтительно, поксвирусный вектор, например вектор MVA или MVA-BN.

[0141] В соответствии с вариантами осуществления изобретения, вакцинные композиции могут также содержать один или более дополнительных векторов, например вирусные векторы, такие как аденовирусные векторы, предпочтительно векторы аденовируса 26, кодирующие один или более дополнительных антигенных полипептидов ВИЧ и/или один или более выделенных антигенных полипептидов ВИЧ. Синтетический белок оболочки ВИЧ, дополнительные векторы и/или один или более выделенных антигенных полипептидов ВИЧ могут быть получены в виде одной и той же композиции или одной или более различных композиций в вакцине.

[0142] Настоящее изобретение также относится к вакцинным комбинациям для примирования и усиления иммунного ответа на один или более клонотипов ВИЧ у пациента, с использованием одного или более векторов, необязательно в комбинации с выделенным антигенным полипептидом. Таким образом, в другом своем общем аспекте, изобретение относится к вакцинной комбинации для индукции у пациента иммунного ответа против ВИЧ, содержащей:

(a) первую вакцинную композицию, включающую иммунологически эффективное количество поксвирусного вектора, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую первый антиген Env ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, а также, но необязательно, последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую дополнительные антигены ВИЧ, предпочтительно, один или более антигенов ВИЧ, содержащих аминокислотные последовательности, выбранные из SEQ ID NO: 1-5, 28 и 29; и по меньшей мере одну из:

(b) (i) второй вакцинной композиции, включающей иммуногенно эффективное количество одного или более аденовирусных векторов, кодирующих один или более антигенов ВИЧ, содержащих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-5, 18, 28, и 29; и

(b) (ii) третьей вакцинной композиции, включающей один или более полипептидов, содержащих иммуногенно эффективное количество выделенного антигенного полипептида ВИЧ,

где первая композиция и вторая и/или третья композиции присутствуют в одной и той же композиции или в одной или более различных композициях.

[0143] В некоторых вариантах осуществления изобретения, первая вакцинная композиция содержит вектор MVA, кодирующий первый антиген Env ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; второй антиген Env ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; третий и четвертый антигены Gag ВИЧ, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, соответственно; и пятый и шестой антигены Pol ВИЧ, содержащие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, соответственно. В

некоторых вариантах осуществления изобретения, антигены Gag и Pol SEQ ID NO: 1 и 3 объединяют и представляют в виде гибридного антигена Gag-Pol, содержащего SEQ ID NO: 28, и/или антигены Gag и Pol SEQ ID NO: 2 и 4 объединяют и представляют в виде гибридного антигена Gag-Pol, содержащего SEQ ID NO: 29.

[0144] В некоторых вариантах осуществления изобретения, вторая вакцинальная композиция содержит вектор Ad26, кодирующий антиген ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; вектор Ad26, кодирующий антиген ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, вектор Ad26, кодирующий антиген ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; и вектор Ad26, кодирующий антиген ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

[0145] В некоторых вариантах осуществления изобретения, вакцинальная комбинация включает один или более полипептидов, содержащих иммуногенно эффективное количество выделенного антигенного полипептида ВИЧ. Предпочтительно, выделенный антигенный полипептид ВИЧ содержит остатки 30-708 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 или остатки 30-724 SEQ ID NO: 36. В некоторых вариантах осуществления изобретения, два выделенных антигенных полипептида ВИЧ вводят вместе в одной композиции, например, первый выделенный антигенный полипептид ВИЧ, который содержит остатки 30-708 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, и второй выделенный антигенный полипептид ВИЧ, который содержит остатки 30-724 SEQ ID NO: 36. Выделенный антигенный полипептид ВИЧ может присутствовать в третьей композиции или в первой и/или второй композициях. Первая или вторая композиции могут быть введены вместе с одним или несколькими выделенными антигенными полипептидами ВИЧ, предпочтительно gp140, для примирования и/или бустинга.

[0146] Используемые здесь термины «совместная доставка», «совместное введение» или «введение вместе с ...» относятся к одновременному введению двух или более компонентов, таких как вирусный экспрессионный вектор и выделенный антигенный полипептид, или множество вирусных экспрессионных векторов. «Одновременное введение» может представлять собой введение двух или более компонентов по меньшей мере в течение одного дня. Если два компонента «вводятся вместе с ...», то они могут быть введены в виде отдельных композиций последовательно в течение короткого периода времени, такого как 24, 20, 16, 12, 8 или 4 часа, или в течение 1 часа или менее, например, по существу, одновременно, или они могут быть введены в одной композиции одновременно.

[0147] В другом своем общем аспекте, настоящее изобретение относится к набору, содержащему комбинацию вакцин согласно варианту осуществления изобретения.

[0148] Другие варианты синтетического белка оболочки ВИЧ, экспрессионных векторов, дополнительных экспрессионных векторов, антигенов ВИЧ, кодируемых экспрессионными векторами, и выделенного антигенного полипептида ВИЧ и т.п.,

которые могут быть использованы в комбинациях вакцин согласно изобретению, подробно обсуждаются выше и в иллюстративных примерах, представленных ниже.

[0149] Способ выработки протективного иммунитета против ВИЧ-инфекции.

[0150] Настоящее изобретение также относится к способу индукции иммунного ответа против ВИЧ одного или более клонотипов у пациента. Описанные здесь способы включают способы примирования и усиления иммунного ответа с использованием одного или более экспрессионных векторов, необязательно в комбинации с одним или более выделенными антигенными полипептидами.

[0151] В соответствии с вариантами осуществления изобретения, термин «индуцирование иммунного ответа», если он относится к описанным здесь способам и композициям, включает обеспечение протективного иммунитета и/или вакцинацию пациента против инфекции, такой как ВИЧ-инфекция, в профилактических целях, а также выработку нужного иммунного ответа или эффекта у пациента, против инфекции, такой как ВИЧ-инфекция, в терапевтических целях, то есть, для терапевтической вакцинации. «Индукция иммунного ответа» также включает выработку терапевтического иммунитета против патогенного агента, то есть ВИЧ. Обычно, для профилактической вакцинации, композиции и вакцины вводят пациентам, которые ранее не были инфицированы ВИЧ, тогда как для терапевтической вакцинации, композиции и вакцины вводят пациенту, уже инфицированному ВИЧ. Иммунный ответ может представлять собой клеточный иммунный ответ и/или гуморальный иммунный ответ.

[0152] Используемый здесь термин «протективный иммунитет» или «протективный иммунный ответ» означает, что организм вакцинированного пациента способен бороться с инфекцией, вызываемой патогенным агентом, против которого была сделана вакцинация. Обычно, у пациента, у которого вырабатывается «протективный иммунный ответ», развиваются только легкие или умеренные клинические симптомы или эти симптомы вообще отсутствуют. Обычно пациент, имеющий «протективный иммунный ответ» или «протективный иммунитет» против определенного агента, не умирает в результате инфицирования указанным агентом.

[0153] Используемый здесь термин «терапевтический иммунитет» или «терапевтический иммунный ответ» означает, что организм ВИЧ-инфицированного пациента после вакцинации способен бороться с инфекцией, вызываемой патогенным агентом, то есть, ВИЧ, против которого была сделана вакцинация. Обычно, введение вакцинных композиций для примирования и бустинга в соответствии с вариантами осуществления изобретения в терапевтических целях будет приводить к выработке иммунного ответа против ВИЧ после ВИЧ-инфицирования или развития симптомов, характерных для ВИЧ-инфекции. Предпочтительно, способы согласно изобретению осуществляют в терапевтических целях, например, для терапевтической вакцинации, при которой описанные здесь композиции и вакцины вводят пациенту, уже инфицированному ВИЧ. Таким образом, группа пациентов, которой проводят лечение в соответствии с описанными здесь способами согласно изобретению, предпочтительно представляет

собой группу ВИЧ-инфицированных пациентов, а более предпочтительно, ВИЧ-инфицированных пациентов. Используемые здесь термины «ВИЧ-инфекция» и «ВИЧ-инфицированный» относятся к заражению человека-хозяина вирусом ВИЧ. Используемый здесь термин «ВИЧ-инфицированный пациент» относится к ВИЧ-положительному пациенту, у которого затем этот вирус реплицировался и размножился, в результате чего возникала вероятность заражения хозяина ВИЧ или уже наблюдалось наличие ВИЧ-инфекции или ее симптомов.

[0154] В одном общем аспекте изобретения, способ индукции иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) у пациента включает введение пациенту композиции, содержащей иммуногенно эффективное количество экспрессионного вектора, а предпочтительно поксвирусного вектора (например, MVA или MVA-BN), содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую синтетический белок оболочки ВИЧ, включающий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и предпочтительно кодирующую дополнительные антигены ВИЧ, описанные в настоящей заявке. Любая из описанных здесь композиций может быть использована в способе индукции иммунного ответа против ВИЧ у пациента. Композиция может также содержать один или более дополнительных векторов, например аденовирус, кодирующий те же самые или один или более дополнительных антигенов ВИЧ и/или один или более дополнительных выделенных антигенных полипептидов ВИЧ. Один и тот же вектор, кодирующий белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, может также кодировать один или более дополнительных антигенов ВИЧ. Это особенно предпочтительно для поксвирусных векторов, таких как MVA, включая MVA-BN, как описано в настоящей заявке.

[0155] В другом общем аспекте изобретения, способ индукции иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) у пациента включает введение пациенту:

(a) первой вакцины, содержащей один или более рекомбинантных аденовирусных векторов, предпочтительно векторов Ad26, кодирующих одну или более из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 18, 28 и 29; и

(b) второй вакцины, содержащей поксвирусный вектор, а предпочтительно, вектор MVA, кодирующий SEQ ID NO: 18, а предпочтительно, также кодирующий один или более антигенов ВИЧ, содержащих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-5, 28 и 29, где

стадии (a) и (b) проводят в любом порядке, и где одной из стадий является первичная иммунизация, а другой стадией является бустер-иммунизация.

[0156] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ индукции иммунного ответа также включает введение пациенту одного или более выделенных антигенных полипептидов ВИЧ, предпочтительно, одного или более антигенных полипептидов ВИЧ, включающих (i) полипептид, содержащий остатки 30-708 аминокислоты последовательность SEQ ID NO: 7, или (ii) полипептид, содержащий остатки 30-724 SEQ ID NO: 36, или (iii) оба полипептида (i) и (ii). Один или более

выделенных антигенных полипептидов ВИЧ могут присутствовать в одной и той же композиции, в виде первой и/или второй композиции или в одной или более дополнительных композиций. В предпочтительном варианте осуществления изобретения, один или более выделенных антигенных полипептидов ВИЧ вводят приблизительно одновременно с композицией, используемой для бустер-иммунизации. В некоторых вариантах осуществления изобретения, один или более выделенных антигенных полипептидов ВИЧ присутствуют в одной и той же композиции вместе с бустер-вакциной. В других вариантах осуществления изобретения, один или более выделенных антигенных полипептидов ВИЧ присутствуют в композиции отдельно от бустер-вакцины. В некоторых вариантах осуществления изобретения, выделенный антигенный полипептид ВИЧ присутствует в композиции, содержащей адъювант, например, фосфат алюминия.

[0157] В конкретном варианте способа индукции иммунного ответа согласно изобретению, первая композиция содержит аденовирусный вектор, предпочтительно, вектор аденовируса 26, кодирующий синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и второй аденовирусный вектор, предпочтительно, вектор аденовируса 26, кодирующий антиген ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; вторая композиция содержит поксвирусный вектор, предпочтительно, вектор MVA, такой как вектор MVA-BN согласно изобретению, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую синтетический антиген ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и предпочтительно, также содержит последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую один или более антигенов ВИЧ, содержащих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-5 28 и 29, а более предпочтительно антигены ВИЧ, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5, 28 и 29, где первую композицию вводят пациенту один или более раз для первичной иммунизации, а вторую композицию вводят пациенту один или более раз для бустер-иммунизации, или где первую композицию вводят пациенту один или более раз для бустер-иммунизации, а вторую композицию вводят пациенту один или более раз для первичной иммунизации. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, первая композиция также содержит третий аденовирусный вектор, предпочтительно вектор Ad26, кодирующий антигенный полипептид ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и четвертый аденовирусный вектор, предпочтительно, вектор Ad26, кодирующий антигенный полипептид ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

[0158] В другом конкретном варианте осуществления способа индукции иммунного ответа, первая композиция включает первый аденовирусный вектор, предпочтительно, вектор аденовируса 26, кодирующий синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и второй аденовирусный вектор, предпочтительно, вектор аденовируса 26, кодирующий антиген ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; вторая

композиция содержит поксвирусный вектор, предпочтительно, вектор MVA, а более предпочтительно, MVA-BN, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую антигены ВИЧ, содержащие аминокислотную последовательности SEQ ID NO: 1-5 и 18, а более предпочтительно, SEQ ID NO: 5, 18, 28 и 29 и их комбинации; где первую композицию вводят пациенту один или более раз для первичной иммунизации, а вторую композицию вводят пациенту один или более раз для бустер-иммунизации, необязательно вместе с одним или более выделенными антигенными полипептидами ВИЧ; или где вторую композицию вводят пациенту один или более раз для первичной иммунизации, а первую композицию вводят пациенту один или более раз для бустер-иммунизации, необязательно вместе с одним или более выделенными антигенными полипептидами ВИЧ. В предпочтительных вариантах осуществления изобретения, первая композиция также содержит третий аденовирусный вектор, предпочтительно вектор Ad26, кодирующий антигенный полипептид ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и четвертый аденовирусный вектор, предпочтительно, вектор Ad26, кодирующий антигенный полипептид ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

[0159] Введение иммуногенных композиций, содержащих экспрессионные векторы и/или антигенные полипептиды, обычно осуществляют внутримышечно, интрадермально или подкожно. Однако, могут также рассматриваться и другие способы введения, такие как внутривенное, ректальное, кожное, пероральное, интраназальное введение и т.п. Внутримышечное введение иммуногенных композиций может быть осуществлено с помощью иглы для инъекции суспензии экспрессионных векторов, например, аденовирусных векторов и/или антигенных полипептидов. Альтернативой является использование безыгольного устройства для инъекции композиции (с использованием, например, Biojector™) или лиофилизированного порошка, содержащего вакцину.

[0160] Для внутримышечной, внутривенной, кожной или подкожной инъекции или инъекции в участок поражения, вектор может быть получен в форме парентерально приемлемого водного раствора, который является апирогенным и имеет подходящие pH, изотоничность и стабильность. Аналогичным образом, выделенный антигенный полипептид может быть приготовлен в форме парентерально приемлемого раствора, имеющего подходящие pH, изотоничность и стабильность. Специалисты в данной области могут самостоятельно приготовить подходящие растворы, с использованием, например, изотонических носителей, таких как инъекция хлорида натрия, инъекция раствора Рингера, инъекция лактат-содержащего раствора Рингера. При необходимости, могут быть включены консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки. Может быть также использована композиция с пролонгированным высвобождением.

[0161] Обычно, введение вакцинных композиций согласно вариантам изобретения осуществляют в терапевтических целях для вырабатывания иммунного ответа против ВИЧ-антигена после инфицирования или развития симптомов. В других вариантах

осуществления изобретения, экспрессионные векторы, например аденовирусные векторы и/или поксвирусные векторы, и/или антигенные полипептиды ВИЧ могут быть введены в профилактических целях перед инфицированием или развитием симптомов.

[0162] Иммуногенные композиции, содержащие экспрессионные векторы, например, аденовирусные векторы и/или поксвирусные векторы, и/или антигенные полипептиды вводят пациенту для выработки иммунного ответа против ВИЧ у пациента. Количество композиции, достаточное для индукции детектируемого иммунного ответа, определяется как «иммуногенно эффективная доза» или «иммуногенно эффективное количество». В типичном варианте осуществления изобретения, иммунный ответ представляет собой терапевтический иммунный ответ.

[0163] Фактически введенное количество, а также скорость и время введения будут зависеть от природы и тяжести заболевания, подвергаемого лечению. Назначение лечения, например, определение дозировки и т.п. входит в компетенцию врачей общей практики и другого медицинского персонала, или, ветеринара, если речь идет о животных, и обычно зависит от расстройства, подвергаемого лечению, состояния здоровья отдельного пациента, участка доставки, способа введения и других факторов, известных практикующим врачам. Примеры методов и протоколов, упомянутых выше, можно найти в руководстве Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. ed., 1980.

[0164] После получения аденовирусных векторов и/или поксвирусных векторов, таких как векторы MVA, и необязательного введения таких частиц в композиции, векторы могут быть введены пациенту, а в частности, человеку или другому примату. Доставка млекопитающему, не являющемуся человеком, не обязательно должна быть осуществлена в терапевтических целях, но может быть использована в экспериментах, например, при исследовании механизмов иммунных ответов на синтетический белок оболочки ВИЧ и другие антигены ВИЧ, экспрессируемые аденовирусными векторами и/или поксвирусными векторами согласно изобретению.

[0165] В одном варианте осуществления раскрытых способов, один или более аденовирусных векторов, кодирующих один или более антигенов ВИЧ, раскрытых в настоящей заявке, используют для инициации иммунного ответа. Один или более выделенных антигенных полипептидов ВИЧ могут быть использованы вместе с одним или более аденовирусными векторами для первичной иммунизации. В другом варианте осуществления изобретения, один или более поксвирусных векторов, предпочтительно, MVA или MVA-BN, поксвирусные векторы, кодирующие один или более антигенов ВИЧ согласно изобретению, используют для инициации иммунного ответа. Один или более выделенных антигенных полипептидов ВИЧ могут быть использованы вместе с одним или более поксвирусными векторами для первичной иммунизации. Первичная иммунизация может быть проведена только один раз, но при желании, ее можно также проводить несколько раз, например, сначала примирование на время 0, а затем другое примирование приблизительно через 1-24 недели после первого примирования. Один или более выделенных антигенных полипептидов ВИЧ вместе с одним или более



дополнительными аденовирусными или поксвирусными векторами, кодирующими один или более дополнительных антигенов ВИЧ, могут быть использованы, но необязательно, для усиления иммунного ответа.

[0166] После примирования, один или более аденовирусных векторов согласно изобретению или поксвирусных векторов согласно изобретению могут быть использованы для одной или более бустер-иммунизаций. Бустер-иммунизация может быть также проведена один или несколько раз, например, сначала приблизительно через 4-52 недели после первоначального примирования, а затем, но необязательно, может быть проведена другая бустер-иммунизация, например, приблизительно через 8-100 недель после первого примирования. В некоторых других вариантах осуществления изобретения, один или более аденовирусных векторов согласно изобретению вводят вместе с одним или более поксвирусными векторами согласно изобретению для примирования и/или бустер-иммунизации. Затем проводят мониторинг иммунного ответа, индуцируемого иммунизацией.

[0167] Схемы прайм-бустинга обычно являются предпочтительными для выработки сильных иммунных ответов. Один и тот же вектор может быть введен несколько раз, и такое введение называется гомологичным прайм-бустом. В соответствии с настоящим изобретением, обычно предпочтительно проводить гетерологичную схему прайм-буста, который в данном контексте означает то, что векторы для примирования и бустинга являются различными. В некоторых таких вариантах осуществления гетерологичной схемы прайм-буста, например, примирование осуществляют аденовирусным вектором, например Ad26, а бустинг осуществляют с помощью поксвирусного вектора, например, MVA, например, MVA-BN. В других таких вариантах осуществления гетерологичной схемы прайм-буста, например, примирование осуществляют с помощью поксвирусного вектора, например, MVA, такого как, MVA-BN, а бустинг осуществляют с помощью аденовирусного вектора, например Ad26. В схемах прайм-буста, выделенный антигенный полипептид ВИЧ, такой как gp140, может быть введен, но необязательно, одновременно с примированием или бустер-введением такого аденовирусного или поксвирусного вектора.

[0168] В одном репрезентативном и неограничивающем варианте осуществления изобретения, пациенту вводят четыре различных вектора аденовируса 26, которые вместе кодируют антигены ВИЧ, содержащие SEQ ID NO: 5, 18, 28 и 29, где векторы присутствуют в отношении 1:1:1:1, и эти векторы вводят в общей дозе  $5 \times 10^{10}$  вирусных частиц в 0,5 мл путем внутримышечной инъекции на недели 0 и 12 с последующим введением вектора MVA, кодирующего антигены ВИЧ, содержащие SEQ ID NO: 5, 18, 28 и 29 в дозе приблизительно  $10^8$  бляшкообразующих единиц на 0,5 мл инъекции, вводимой внутримышечно на недели 24 и 48.

[0169] Специалистам в данной области будет очевидно, что схема примирования и бустер-введения может быть скорректирована в зависимости от оцененных иммунных ответов после введения. Так, например, бустер-композиции обычно вводят через недели,

месяцы или даже годы после введения примирующей композиции.

[0170] В соответствии с вариантами осуществления изобретения, адъювант может быть введен вместе с выделенным антигенным полипептидом ВИЧ в процессе первичной и/или бустер-иммунизации. Любой адъювант может быть использован вместе с выделенным антигенным полипептидом ВИЧ в соответствии с настоящим изобретением, а в некоторых вариантах осуществления изобретения, адъювант представляет собой соль алюминия, такую как фосфат алюминия.

[0171] В предпочтительном варианте осуществления изобретения, аденовирусными векторами, используемыми в раскрытых здесь способах, является вектор rAd26, а поксвирусными векторами, используемыми в раскрытых здесь способах, является вектор MVA.

[0172] В одном репрезентативном варианте осуществления изобретения, вектор rAd26, кодирующий синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, используют для инициации иммунного ответа в комбинации с вектором rAd26, кодирующим антиген ВИЧ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5. Один или более дополнительных векторов rAd26, кодирующих один или более дополнительных антигенов ВИЧ, имеющих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4, 28 и 29, также могут быть введены вместе с другими векторами rAd26 для инициации иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, примирующее введение может быть проведено повторно до проведения любой бустер-иммунизации. Вектор MVA, кодирующий синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, а также кодирующий SEQ ID NO: 5, 28 и 29, используют для усиления иммунного ответа в этих вариантах. Выделенный антигенный полипептид ВИЧ, такой как полипептид, содержащий остатки 30-708 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, или полипептид, содержащий остатки 30-724 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36, или комбинацию по меньшей мере двух таких выделенных антигенных полипептидов ВИЧ, вводят, но необязательно, вместе с вектором MVA для усиления иммунного ответа. Предпочтительно, адъювант также вводят вместе с выделенным антигенным полипептидом ВИЧ для бустер-иммунизации.

[0173] В другом репрезентативном варианте осуществления изобретения, вектор MVA или MVA-BN, кодирующий синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, а также кодирующий SEQ ID NO: 5, 28 и 29, используют для инициации иммунного ответа. В некоторых вариантах осуществления изобретения, примирующее введение проводят повторно до проведения любой бустер-иммунизации. После примирующего введения проводят одну или более бустер-иммунизаций, где бустер-иммунизация включает введение вектора rAd26, кодирующего синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18 в комбинации с вектором rAd26, кодирующим антиген ВИЧ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5. Один или более

дополнительных векторов гAd26, кодирующих один или более дополнительных антигенных полипептидов ВИЧ, имеющих аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1-4, 28 и 29, также предпочтительно вводят вместе с другими векторами гAd26 для усиления иммунного ответа. Выделенный антигенный полипептид ВИЧ, такой как полипептид, содержащий остатки 30-708 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, или полипептид, содержащий остатки 30-724 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36, или комбинацию по меньшей мере двух таких выделенных антигенных полипептидов ВИЧ вводят, но необязательно, вместе с векторами гAd26 для усиления иммунного ответа.

[0174] В конкретном репрезентативном варианте осуществления изобретения, иммунный ответ стимулируется введением четырех антигенов ВИЧ, кодируемых на аденовирусных векторах, предпочтительно на векторах гAd26, причем эти четыре кодируемых антигена представляют собой: (i) синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, (ii) антиген Env ВИЧ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, (iii) гибридный антиген Gag-Pol ВИЧ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, и (iv) гибридный антиген Gag-Pol ВИЧ, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29. Каждый из этих четырех антигенов может кодироваться на отдельном аденовирусном векторе, предпочтительно на векторе гAd26, вводимом в общей дозе приблизительно  $1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$  или  $10 \times 10^{10}$  вирусных частиц (ВЧ), например приблизительно  $5 \times 10^{10}$  ВЧ (для всех векторов вместе). Векторы могут быть предварительно смешаны, например, в соотношении 1:1:1:1. Введение аденовирусных векторов предпочтительно осуществляют путем внутримышечной инъекции. Примирующее введение может быть повторно проведено после первого примирующего введения. В этом варианте осуществления изобретения, иммунный ответ усиливается введением вектора MVA или MVA-BN, кодирующего четыре антигена ВИЧ, содержащих SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29 в дозе от  $10^5$  до  $10^{11}$  БОЕ, например, в дозе  $10^7$  БОЕ,  $10^8$  БОЕ или  $10^9$  БОЕ или в дозе  $10^5$ - $10^{10}$  TCID<sub>50</sub>, например,  $10^7$ ,  $10^8$  или  $10^9$  TCID<sub>50</sub>. Предпочтительная доза составляет от  $2 \times 10^5$  до  $5 \times 10^8$  БОЕ. Предпочтительная доза для человека содержит по меньшей мере  $5 \times 10^7$  БОЕ, например, по меньшей мере  $1 \times 10^8$  БОЕ или альтернативно, по меньшей мере  $2 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>, по меньшей мере  $3 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>, по меньшей мере  $5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>, например, по меньшей мере по меньшей мере  $1 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>, или по меньшей мере  $2 \times 10^8$  TCID<sub>50</sub>. Введение MVA или MVA-BN для усиления иммунного ответа может быть осуществлено в любое время после первого примирующего введения. Бустер-введение может быть осуществлено повторно после первого бустер-введения. Все введения MVA согласно этому варианту осуществления изобретения могут быть осуществлены, например, внутримышечно или подкожно.

[0175] Альтернативно, вектор MVA может быть использован для примирующего введения, а векторы Ad26 для бустер-введения, и эти векторы, по существу, вводят как

указано выше, за исключением обратного порядка введения аденовирусного и поксвирусного векторов. Выделенный белок gp140 может быть введен, но необязательно, вместе с бустер-введением. Так, например, выделенный белок gp140 Env, например белок gp140 кладотипа С (содержащий остатки 30-708 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7), или мозаичный белок gp140 (содержащий остатки 30-724 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36), или белок gp140 кладотипа С и мозаичный белок gp140, в общей дозе приблизительно 50-300 мкг белка, например 50 или 250 микрограммов белка gp140 кладотипа С или, например, 50 или 250 микрограммов мозаичного белка gp140, или, например, 50 или 250 микрограммов комбинации белка gp140 кладотипа С и мозаичного белка gp140 (например, в отношении 1:1, вводимые либо в виде смеси, либо отдельно) могут быть введены вместе с поксвирусным вектором для бустер-иммунизации. Предпочтительно, белок gp140 вводят вместе с адьювантом, например фосфатом алюминия.

[0176] В некоторых вариантах осуществления изобретения, способ индукции иммунного ответа согласно изобретению также включает введение агента для очистки латентного вирусного резервуара. Клетки, латентно инфицированные ВИЧ, несут интегрированный вирус, который является транскрипционно молчащим, что затрудняет эффективное устранение ВИЧ-инфекции у пациентов, подвергаемых лечению. Используемый здесь термин «агент для очистки резервуара» и «агент для очистки латентного вирусного резервуара» означает вещество, которое уменьшает латентный пул ВИЧ посредством реактивации резервуаров ВИЧ, например, путем индукции экспрессии молчащего ВИЧ. Примерами агентов для очистки латентного вирусного резервуара, подходящих для использования в настоящем изобретении, являются, но не ограничиваются ими, ингибиторы гистон-деацетилазы (HDAC) и модуляторы ловушко-подобных рецепторов (например, TLR7), описанные в заявках WO2016/007765 и WO2016/177833, содержание которых в полном объеме включено в настоящее описание посредством ссылки. Агент для очистки латентного вирусного резервуара может быть введен до, во время и/или после одной или более описанных здесь примирующих и бустер-иммунизаций. Было показано, что вакцинация комбинацией векторов аденовируса 26, кодирующих антигены Gag, Pol и Env, в качестве затравки с последующим введением векторов MVA, кодирующих такие антигены, в качестве бустер-иммунизации, в комбинации со стимуляцией TLR7, приводит к улучшению вирусологического контроля и замедлению обратного действия вируса после прерывания противоретровирусной терапии в исследованиях на макак-резусах с моделью заболевания, что продемонстрировало возможность проведения терапевтической вакцинации в комбинации с природной иммуностимуляцией для достижения более эффективного лечения ВИЧ-инфекции (Borducchi EN, et al, 2016, Nature 540: 284-287 (doi: 10/1038/nature20583)).

[0177] В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанные здесь примирующие и бустер-иммунизации для индукции иммунного ответа могут быть объединены со стандартным лечением, например антиретровирусной терапией (АРТ).

Пациенты, которые подвергаются лечению в соответствии с прайм/буст-иммунизацией согласно изобретению, могут также проходить АРТ любыми антиретровирусными лекарственными средствами, известными специалистам в данной области, в соответствии с раскрытием настоящего изобретения. АРТ представляет собой лекарственную терапию для лечения ВИЧ-инфекции, хотя используемые лекарственные средства не уничтожают вирус или не излечивают от такой вирусной инфекции. Тем не менее, при приеме этих средств в комбинации, они могут предотвращать размножение вируса. При замедлении размножения вируса, замедляется и развитие заболевания, вызываемого ВИЧ. Антиретровирусные лекарственные средства обозначаются ARV. Комбинированная ARV-терапия (кАРТ) называется высокоактивной АРТ (ВААРТ). Специалист в данной области может назначить подходящую антиретровирусную терапию, определить частоту введения и дозу лекарственного средства для АРТ и т.п., так, чтобы они были совместимы с проведением прайм/буст-иммунизации согласно изобретению.

[0178] Примерами антиретровирусных лекарственных средств, используемых для АРТ, являются, но не ограничиваются ими, нуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (NRTI, неограничивающие примеры которых включают зидовудин, диданозин, ставудин, ламивудин, абакавир, тенофовир, комбивир [комбинация зидовудина и ламивудина], тризивир [комбинация зидовудина, ламивудина и абакавира], эмтрицитабин, трувада [комбинация эмтрицитабина и тенофовира] и эпциком [комбинация абакавира и ламивудина]), ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (NNRTI, не ограничивающие примеры которых включают невирапин, делавирдин, эфавиренц, этравирин и рилпивирин), ингибиторы протеаз (ИП, неограничивающие примеры которых включают саквинавир, индинавир, ритонавир, нельфинавир, ампренавир, лопинавир/ритонавир, атазанавир, фозампренавир, типранавир, дарунавир), ингибиторы интегразы (INSTI, не ограничивающие примеры которых включают ралтегравир, элвитегравир и долутегравир) и ингибиторы слияния, ингибиторы проницаемости и/или антагонисты рецептора хемокина (FI, антагонисты CCR5; неограничивающие примеры которых включают энфувиртид, аплавирок, маравирок, викривирок и кникривирок).

[0179] В других вариантах осуществления изобретения, АРТ пациента прерывают (иначе говоря, прекращают) после завершения прайм/буст-иммунизации в соответствии с вариантами осуществления изобретения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, «антиретровирусная аналитическая терапия» (ARV ATI) пациента может быть прервана после завершения прайм/буст-иммунизации в соответствии с вариантами осуществления изобретения. Термины «прерывание антиретровирусной аналитической терапии» и «ARV ATI», используемые в настоящем изобретении, означают временное прекращение лечения антиретровирусными средствами для оценки подавления вируса и вирусологического контроля в промежутке между периодами непрерывной АРТ. Обычно, пациенты могут подвергаться ARV ATI, то есть, АРТ может быть прекращена, если уровни РНК ВИЧ в плазме пациента составляют менее 50 копий/мл в течение по меньшей

мере приблизительно 52 недель, но пациент все еще может подвергаться ARV АТІ, даже если у него наблюдаются один или более выбросов (то есть, случаев) повышения РНК ВИЧ в плазме от более 50 копий/мл до менее 200 копий/мл в течение этого периода, при условии, что при скрининге непосредственно перед ARV АТІ было зарегистрировано менее, чем 50 копий/мл РНК ВИЧ в плазме.

[0180] В соответствии с вариантами осуществления изобретения, АРТ может быть прекращена приблизительно через 4-20 недель после последнего введения бустер-вакцины. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пациентам, которые проходят АРТ на основе ненуклеозидного ингибитора обратной транскриптазы (NNRTI), вместо NNRTI, может быть введен ингибитор протеазы в бустер-дозе приблизительно за 1-2 недели до прекращения АРТ в целях снижения риска развития резистентности к NNRTI. Также может быть введен активатор (например, ингибитор гистон-деацетилазы или модулятор TLR7) на стадии АТІ для активации любого (например, латентного) резервуара ВИЧ и, таким образом, усиления иммунного ответа.

[0181] Наблюдение пациентов, проходящих ARV АТІ, может быть осуществлено, например, путем измерения уровней РНК ВИЧ в плазме. Так, например, наблюдение после начала ARV АТІ может осуществляться до двух раз в неделю в течение первых шести недель, когда повторная вирусемия становится наиболее вероятной. «Вспышка вирусемии» определяется как уровень РНК ВИЧ в плазме, который превышает 1000 копий/мл после ARV АТІ. АРТ может быть возобновлена у пациентов со вспышкой вирусемии. Предпочтительно, чтобы у пациента, подвергаемого лечению способами согласно изобретению, поддерживался вирусемический контроль после прерывания АРТ. Используемый здесь термин «поддерживание вирусемического контроля» определяется как уровни РНК ВИЧ в плазме, составляющие менее, чем 50 копий/мл по меньшей мере через 24 недели после ARV АТІ. Критерий «поддерживания вирусемического контроля» все еще удовлетворяется, если наблюдается один или более случаев повышения уровней РНК ВИЧ в плазме от более, чем 50 копий/мл до менее 1000 копий/мл, при условии, что у пациента уровни РНК ВИЧ в плазме не будут превышать 1000 копий/мл при двух последующих определениях с интервалом по меньшей мере в одну неделю.

[0182] Обычно (если не применяются способы согласно изобретению), у ВИЧ-инфицированных пациентов наблюдается возвращение вирусемии через 2-3 недели после прерывания АРТ. Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, авторы лишь предполагают, что прайм/буст-иммунизация, проводимая в соответствии с вариантами осуществления изобретения среди пациентов с полным ингибированием ВИЧ, будет давать детектируемый иммунный ответ и поддерживать вирусемический контроль после ARV АТІ по меньшей мере у некоторых пациентов. В некоторых вариантах осуществления изобретения, пациенты могут прекратить АРТ после лечения способом согласно изобретению. АРТ может быть прекращена на длительное время (например, по меньшей мере на 24 недели, а предпочтительно, на больший срок, например, по меньшей мере приблизительно на 28, 32, 36, 40, 44, 48, 52 недели, 16 месяцев, 18, 20, 22, 24 месяцев

или даже более). Такие периоды времени, когда АРТ прекращают или прерывают, называются «каникулами» или «АРТ-каникулами» или «лекарственными каникулами». В других вариантах осуществления изобретения, вакциноterapia, осуществляемая способами согласно изобретению, может обеспечивать ремиссию ВИЧ, что означает поддержание супрессии вируса в отсутствие АРТ.

#### Варианты осуществления изобретения

[0183] Вариант 1 представляет собой поксвирусный вектор, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

[0184] Вариант 2 представляет собой поксвирусный вектор, включающий нуклеиновую кислоту, кодирующую:

(a) первый антиген оболочки ВИЧ (Env), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18;

(b) второй антиген Env ВИЧ, отличающийся от первого антигена Env ВИЧ;

(c) третий антиген и четвертый антиген, которые представляют собой два различных антигена Gag ВИЧ; и

(d) пятый антиген и шестой антиген, которые представляют собой два различных антигена Pol ВИЧ.

[0185] Вариант 3 представляет собой поксвирусный вектор варианта 2, где второй антиген Env ВИЧ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, третий и четвертый антигены содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2 соответственно; а пятый и шестой антигены содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4 соответственно.

[0186] Вариант 4 представляет собой поксвирусный вектор вариантов 2 или 3, где третий и пятый антигены вместе составляют первый гибридный антиген Gag-Pol, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28, а четвертый и шестой антигены вместе составляют второй гибридный антиген Gag-Pol, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

[0187] Вариант 5 представляет собой поксвирусный вектор любого из вариантов 1-4, где первый антиген Env ВИЧ кодируется SEQ ID NO: 41.

[0188] Вариант 6 представляет собой поксвирусный вектор любого из вариантов 4-5, где первый антиген Env ВИЧ кодируется SEQ ID NO: 41; второй антиген Env ВИЧ кодируется SEQ ID NO: 39; первый гибридный антиген Gag-Pol кодируется SEQ ID NO: 38; а второй гибридный антиген Gag-Pol кодируется SEQ ID NO: 40.

[0189] Вариант 7 представляет собой поксвирусный вектор любого из вариантов 1-6, где нуклеиновая кислота, кодирующая антиген(ы), функционально присоединена к промоторной последовательности.

[0190] Вариант 8 представляет собой поксвирусный вектор любого из вариантов 1-7, где поксвирусный вектор представляет собой рекомбинантный модифицированный вектор вируса осповакцины Анкара (MVA).

[0191] Вариант 9 представляет собой поксвирусный вектор варианта 8, где вектор MVA включает MVA-BN или его производные.

[0192] Вариант 10 представляет собой поксвирусный вектор варианта 8 или 9, где первый гибридный антиген Gag-Pol и второй антиген Env встроены в межгенную область (IGR) 44/45 генома MVA, а второй гибридный антиген Gag-Pol и первый антиген Env встроены в IGR 88/89 генома MVA.

[0193] Вариант 11 представляет собой поксвирусный вектор любого из вариантов 7-10, где каждый первый гибридный антиген Gag-Pol и второй гибридный антиген Gag-Pol находятся под контролем отдельного промотора Pr13.5, а каждый первый и второй антигены Env находятся под контролем отдельного промотора PrHyb.

[0194] Вариант 12 представляет собой выделенную клетку, содержащую поксвирусный вектор любого из вариантов 1-11.

[0195] Вариант 13 представляет собой композицию, содержащую вектор любого из вариантов 1-11 и носитель.

[0196] Вариант 14 представляет собой вакцину, содержащую иммуногенно эффективное количество поксвирусного вектора согласно любому из вариантов 1-11, и фармацевтически приемлемый носитель.

[0197] Вариант 15 представляет собой вакцинную комбинацию, включающую:

(а) первую вакцинную композицию, содержащую иммуногенно эффективное количество поксвирусного вектора, предпочтительно вектора MVA, согласно любому из вариантов 1-11; и по меньшей мере одну из

(b) (i) второй вакцинной композиции, включающей иммуногенно эффективное количество одного или более аденовирусных векторов, предпочтительно, векторов аденовируса 25, кодирующих один или более антигенов ВИЧ, где один или более антигенов ВИЧ предпочтительно содержат аминокислотную последовательность, выбранную из группы состоящий из SEQ ID NO: 1-5, 18, 28 и 29; и

(b) (ii) третьей вакцинной композиции, включающей один или более полипептидов, содержащих иммуногенно эффективное количество выделенного антигенного полипептида ВИЧ, а также, но необязательно, включающей адьювант, предпочтительно, фосфат алюминия, где первая композиция и вторая и/или третья композиция присутствуют в одной и той же композиции или в одной или более различных композициях.

[0198] Вариант 16 представляет собой вакцинную комбинацию согласно варианту 15, где один или более выделенных антигенных полипептидов ВИЧ в третьей вакцинной композиции включают: (i) полипептид, содержащий остатки 30-708 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 или (ii) полипептид, содержащий остатки 30-724 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36, или (iii) оба полипептида (i) и (ii).

[0199] Вариант 17 представляет собой вакцинную комбинацию любого из вариантов 15-16, где вторая вакцинная композиция содержит рекомбинантные векторы аденовируса 26, которые вместе кодируют SEQ ID NO: 1-5 и 18, а предпочтительно, где



SEQ ID NO: 1 и 3, взятые вместе, представляют собой SEQ ID NO: 28 и/или SEQ ID NO: 2 и 4, взятые вместе, представляют собой SEQ ID NO: 29.

[0200] Вариант 18 представляет собой вакцинную комбинацию варианта 17, где вторая вакцинная композиция содержит четыре рекомбинантных вектора Ad26, то есть, первый рекомбинантный вектор Ad26, кодирующий SEQ ID NO: 5; второй рекомбинантный вектор Ad26, кодирующий SEQ ID NO: 18; третий рекомбинантный вектор Ad26, кодирующий SEQ ID NO: 1 и 3, предпочтительно SEQ ID NO: 28; и четвертый рекомбинантный вектор Ad26, кодирующий SEQ ID NO: 2 и 4, а предпочтительно SEQ ID NO: 29.

[0201] Вариант 19 представляет собой способ индукции иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) у пациента, где указанный способ включает введение пациенту композиции варианта 13, вакцины варианта 14 или вакцинной комбинации любого из вариантов 15-18.

[0202] Вариант 20 представляет собой композицию варианта 13, вакцину варианта 14 или вакцинную комбинацию любого из вариантов 15-18 для применения в целях индукции иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ).

[0203] Вариант 21 представляет собой композицию варианта 13 или вакцину варианта 14, также содержащую один или более дополнительных экспрессионных векторов, кодирующих один или более дополнительных антигенов ВИЧ, и/или один или более выделенных антигенных полипептидов ВИЧ.

[0204] Вариант 22 представляет собой композицию варианта 13 или вакцину варианта 14, также содержащую аденовирусный вектор, предпочтительно вектор аденовируса 26, кодирующий синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий, или состоящий из нее, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

[0205] Вариант 23 представляет собой композицию или вакцину согласно варианту 22, также содержащую второй аденовирусный вектор, предпочтительно вектор аденовируса 26, кодирующий антиген ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и, необязательно, один или более дополнительных аденовирусных векторов, а предпочтительно векторов аденовируса 26, кодирующих один или более дополнительных антигенов ВИЧ, содержащих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-4, 28 и 29, предпочтительно SEQ ID NO: 28 и 29, где, более предпочтительно, SEQ ID NO: 28 и 29 кодируются отдельно на третьем и четвертом аденовирусном векторе, а предпочтительно на векторе аденовируса 26.

[0206] Вариант 24 представляет собой способ вырабатывания иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) у пациента, где указанный способ включает введение пациенту композиции или вакцины или вакцинной комбинации согласно любому из вариантов 13-23.

[0207] Вариант 25 представляет собой способ получения композиции или вакцинной комбинации, включающий объединение поксвирусного вектора любого из вариантов 1-11 с носителем и, необязательно, с одним или более дополнительными

векторами, кодирующими один или более дополнительных антигенов ВИЧ и/или один или более выделенных антигенных полипептидов ВИЧ в одной или более композициях вместе с носителем.

[0208] Вариант 26 представляет собой способ индукции иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) у пациента, где указанный способ включает введение пациенту:

(i) первой вакцины, содержащей иммуногенно эффективное количество одного или более рекомбинантных аденовирусных векторов, предпочтительно векторов Ad26, кодирующих один или более антигенов ВИЧ, содержащих аминокислотную последовательность любой одной или более из SEQ ID NO: 1-5, 18, 28 и 29, и носитель;

(ii) второй вакцины, содержащей поксвирусный вектор любого из вариантов 1-11 и носитель; и

(iii) необязательно, третьей вакцины, включающей один или более полипептидов, содержащих иммуногенно эффективное количество выделенных антигенных полипептидов ВИЧ, и носитель, а также, но необязательно, содержащей адьювант, предпочтительно фосфат алюминия,

где стадии (i) и (ii) проводят в любом порядке, причем, одну из стадий проводят для первичной иммунизации, а другую стадию проводят для бустер-иммунизации, и где необязательную третью вакцину вводят вместе с первой композицией или второй композицией для первичной иммунизации и/или бустер-иммунизации.

[0209] Вариант 27 представляет собой способ согласно варианту 26, где третью композицию вводят приблизительно одновременно с введением композиции, используемой для бустер-вакцинации.

[0210] Вариант 28 представляет собой способ согласно варианту 26 или 27, где один или более выделенных антигенных полипептидов ВИЧ включают: (i) полипептид, содержащий остатки 30-708 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7; или (ii) полипептид, содержащий остатки 30-724 SEQ ID NO: 36; или (iii) оба полипептида (i) и (ii), и где один или более выделенных антигенных полипептидов ВИЧ находятся в одной и той же композиции для бустер-вакцинации и/или первичной вакцинации, или в отдельной композиции для бустер-вакцинации и/или первичной вакцинации.

[0211] Вариант 29 представляет собой способ согласно любому из вариантов 26-28, где (i) первая вакцина содержит аденовирусный вектор, предпочтительно вектор аденовируса 26, кодирующий синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, и второй аденовирусный вектор, предпочтительно вектор аденовируса 26, кодирующий антиген ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и, необязательно, один или более дополнительных экспрессионных векторов, предпочтительно, аденовирусных векторов, а более предпочтительно, векторов аденовируса 26, кодирующих один или более дополнительных антигенов ВИЧ; (ii) вторая вакцина содержит поксвирусный вектор, предпочтительно вектор MVA, кодирующий синтетический белок оболочки ВИЧ,

содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, а предпочтительно кодирующий другие антигены ВИЧ, содержащие одну или более аминокислотных последовательностей SEQ ID №: 1-5, 28 и 29; и (iii) третья вакцина содержит выделенный антигенный полипептид ВИЧ, имеющий остатки 30-708 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 или остатки 30-724 SEQ ID NO: 36, где первую вакцину вводят пациенту один или более раз для первичной иммунизации, вторую вакцину вводят пациенту один или более раз для бустер-иммунизации, а третью вакцину вводят пациенту вместе со второй вакциной один или более раз для бустер-иммунизации.

[0212] Вариант 30 представляет собой способ согласно варианту 29, где первая вакцина содержит один или более дополнительных векторов аденовируса 26, кодирующих один или более антигенов ВИЧ, содержащих аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1-4, 28 и 29, а предпочтительно, SEQ ID NO: 28 и 29.

[0213] Вариант 31 представляет собой способ согласно варианту 30, где первая вакцина содержит третий аденовирусный вектор, кодирующий SEQ ID NO: 28, и четвертый аденовирусный вектор, кодирующий SEQ ID NO: 29.

[0214] Вариант 32 представляет собой вакцинную комбинацию, включающую следующие компоненты:

(i) вектор Ad26, кодирующий синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18;

(ii) вектор Ad26, кодирующий белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5;

(iii) вектор Ad26, кодирующий гибридный белок Gag-Pol ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28;

(iv) вектор Ad26, кодирующий гибридный белок Gag-Pol ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29, и

(v) вектор MVA, кодирующий первый белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; второй белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; первый гибридный белок Gag-Pol, содержащий аминокислотная последовательность SEQ ID NO: 28 и второй гибридный белок Gag-Pol, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.

[0215] Вариант 33 представляет собой вакцинную комбинацию согласно варианту 32, дополнительно включающую следующий компонент:

(vi) (vi, a): выделенный антигенный полипептид ВИЧ, имеющий остатки 30-708 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, или (vi, b): остатки 30-724 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36 или (vi, c): оба (vi, a) и (vi, b), где (vi, a), (vi, b) или (vi, c) необязательно дополнительно включают адъювант.

[0216] Вариант 34 представляет собой способ индукции иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) у пациента, где указанный способ включает:

(a) введение пациенту: (i) вектора rAd26, кодирующего синтетический белок

оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; (ii) вектора rAd26, кодирующего антиген, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; (iii) вектора rAd26, кодирующего антиген, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; и (iv) вектора rAd26, кодирующего антиген, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29; где предпочтительно, векторы rAd26 вводят в отношении приблизительно 1:1:1:1 в общей дозе приблизительно  $1-10 \times 10^{10}$  вирусных частиц (ВЧ), например,  $5 \times 10^{10}$  ВЧ;

(b) необязательно повторение стадии (a);

(c) введение пациенту: (i) вектора MVA или MVA-BN, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую (i, a) синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; (i, b) антиген Env ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; (i, c) гибридный антиген Gag-Pol ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; (i, d) гибридный антиген Gag-Pol ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29; предпочтительно, где MVA вводят в дозе от  $10^5$  до  $10^{11}$  БОЕ, например, в дозе  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  или  $10^{10}$  БОЕ, или в дозе  $10^6-10^{10}$  TCID<sub>50</sub>, например,  $10^7-10^9$  TCID<sub>50</sub>; и

(d) необязательно, повторение стадии (c).

[0217] Вариант 35 представляет собой способ индукции иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) у пациента, где указанный способ включает:

(a) введение пациенту: (i) вектора MVA или MVA-BN, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую (i, a) синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; (i, b) антиген Env ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; (i, c) гибридный антиген Gag-Pol ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; (i, d) гибридный антиген Gag-Pol ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29; предпочтительно где MVA вводят в дозе от  $10^5$  до  $10^{11}$  БОЕ, например, в дозе  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  или  $10^{10}$  БОЕ, или в дозе  $10^6-10^{10}$  TCID<sub>50</sub>, например,  $10^7-10^9$  TCID<sub>50</sub>;

(b) необязательно, повторение стадии (a);

(c) введение пациенту: (i) вектора MVA или MVA-BN, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую (i, a) синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; (i, b) антиген Env ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; (i, c) гибридный антиген Gag-Pol ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; (i, d) гибридный антиген Gag-Pol ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29; предпочтительно где MVA вводят в дозе от  $10^5$  до  $10^{11}$  БОЕ, например, в дозе  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$  или  $10^{10}$  БОЕ, или в дозе  $10^6-10^{10}$  TCID<sub>50</sub>, например,  $10^7-10^9$  TCID<sub>50</sub>; и необязательно, введение одного или более из (ii, a) выделенного белка gp140 ВИЧ, имеющего последовательность аминокислот 30-708 SEQ ID NO: 7; (ii, b) выделенного белка gp140 ВИЧ, имеющего последовательность аминокислот 30-724 SEQ ID NO: 36; и (iii) адьюванта на основе фосфата алюминия; где выделенные белки gp140 ВИЧ вводят, но

необязательно, в отношении приблизительно 1:1 в общей дозе приблизительно 50-300 микрограммов, например 250 микрограммов; и

(d) необязательно, повторение стадии (c).

[0218] Вариант 36 представляет собой способ индукции иммунного ответа против ВИЧ у человека, нуждающегося в этом, где указанный способ включает:

(a) введение пациенту вектора MVA или MVA-BN, кодирующего синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29, где вектор MVA или MVA-BN вводят в дозе от  $10^5$  до  $10^{11}$  БОЕ, например, в дозе  $10^7$  БОЕ,  $10^8$  БОЕ,  $10^9$  БОЕ или  $10^{10}$  БОЕ, например, в дозе от  $2 \times 10^7$  до  $5 \times 10^8$  БОЕ, например, в дозе приблизительно  $1 \times 10^8$  БОЕ или в дозе  $10^6$ - $10^{10}$  TCID<sub>50</sub>, например,  $10^7$ - $10^9$  TCID<sub>50</sub>;

(b) необязательно, повторение стадии (a);

(c) введение пациенту: (i) вектора rAd26, кодирующего синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; (ii) вектора rAd26, кодирующего антиген, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; (iii) вектора rAd26, кодирующего антиген, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; (iv) вектора rAd26, кодирующего антиген, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29; и, необязательно, одного или более из: (v, a) выделенного белка gp140 ВИЧ, имеющего последовательность аминокислот 30-708 SEQ ID NO: 7; (v, b) выделенного белка gp140 ВИЧ, имеющего последовательность аминокислот 30-724 SEQ ID NO: 36; (v, c) обоих (v, a) и (v, b); и (v, d) адьюванта на основе фосфата алюминия; предпочтительно, где векторы rAd26 вводят в отношении приблизительно 1:1:1:1 в общей дозе приблизительно  $1$ - $10 \times 10^{10}$  вирусных частиц (ВЧ), например  $5 \times 10^{10}$  ВЧ, и, где, необязательно, выделенные белки gp140 ВИЧ вводят в отношении приблизительно 1:1 в общей дозе приблизительно 50-300 микрограммов, например 250 микрограммов; и

(d) необязательно, повторение стадии (c).

[0219] Вариант 37 представляет собой способ индукции иммунного ответа против ВИЧ у человека, нуждающегося в этом, где указанный способ включает:

(a) введение пациенту: (i) вектора rAd26, кодирующего синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; (ii) вектора rAd26, кодирующего антиген, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; (iii) вектора rAd26, кодирующего антиген, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; и (iv) вектора rAd26, кодирующего антиген, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29; предпочтительно, где векторы rAd26 вводят в отношении приблизительно 1:1:1:1 в общей дозе приблизительно  $1$ - $10 \times 10^{10}$  вирусных частиц (ВЧ), например  $5 \times 10^{10}$  ВЧ;

(b) необязательно, повторение стадии (a);

(c) введение пациенту (i) вектора MVA или MVA-BN, кодирующего синтетический белок оболочки ВИЧ, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18,

SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 28 и SEQ ID NO: 29, где, предпочтительно, вектор MVA или MVA-BN вводят в дозе от  $10^5$  до  $10^{11}$  БОЕ, например, в дозе  $10^7$  БОЕ,  $10^8$  БОЕ,  $10^9$  БОЕ или  $10^{10}$  БОЕ, например, в дозе от  $2 \times 10^7$  до  $5 \times 10^8$  БОЕ, например, в дозе приблизительно  $1 \times 10^8$  БОЕ или в дозе  $10^6$ - $10^{10}$  TCID<sub>50</sub>, например,  $10^7$ - $10^9$  TCID<sub>50</sub>; и (ii, a) выделенного белка gp140 ВИЧ, имеющего последовательность аминокислот 30-708 SEQ ID NO: 7; или (ii, b) выделенного белка gp140 ВИЧ, имеющего последовательность аминокислот 30-724 SEQ ID NO: 36; или (ii, c) двух выделенных белков gp140 ВИЧ, где первый выделенный белок gp140 ВИЧ имеет последовательность аминокислот 30-708 SEQ ID NO: 7, а второй выделенный белок gp140 ВИЧ имеет последовательность аминокислот 30-724 SEQ ID NO: 36, предпочтительно, где эти белки вводят в отношении приблизительно 1:1; и (iii) адьюванта на основе фосфата алюминия; предпочтительно, где выделенный белок gp140 ВИЧ или выделенные белки gp140 ВИЧ вводят в общей дозе приблизительно 50-300 микрограммов, например 250 микрограммов; и

(d) необязательно, повторение стадии (c).

[0220] Вариант 38 представляет собой способ любого из вариантов 26-31 или 34-37, где пациент был инфицирован ВИЧ до проведения первой стадии введения вектора или вакцинного компонента.

[0221] Вариант 39 представляет собой способ любого из вариантов 26-31 или 34-38, дополнительно включающий введение пациенту средства для очистки латентного вирусного резервуара.

[0222] Вариант 40 представляет собой способ варианта 39, в котором агент, очищающий латентный вирусный резервуар, представляет собой модулятор TLR7.

[0223] Вариант 41 представляет собой способ любого из вариантов 26-31 или 34-40, где пациент дополнительно проходит антиретровирусную терапию (АРТ).

[0224] Вариант 42 представляет собой способ варианта 41, где пациент прерывает АРТ после завершения прайм-буст-иммунизации.

[0225] Вариант 43 представляет собой способ варианта 42, где прерывание АРТ инициируют после завершения первичной Ad26-иммунизации и бустер-иммунизации вектором MVA, где, необязательно, бустер-иммунизацию MVA проводят вместе с введением одного или более выделенных белков gp140 Env ВИЧ.

[0226] Вариант 44 представляет собой композицию любого из вариантов 13 или 21-23, вакцину любого из вариантов 14 или 21-23 или вакцинную комбинацию любого из вариантов 15-18 или 32-33 для применения в целях лечения и/или профилактики инфекции и/или заболевания, вызываемого вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).

[0227] Вариант 45 представляет собой композицию любого из вариантов 13 или 21-23, вакцину любого из вариантов 14 или 21-23 или вакцинную комбинацию любого из вариантов 15-18 или 32-33 для применения в целях получения лекарственного препарата для лечения и/или профилактики инфекции и/или заболевания, вызываемого вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).

[0228] Вариант 46 представляет собой применение композиции любого из

вариантов 13 или 21-23, вакцины любого из вариантов 14 или 21-23 или вакцинной комбинации любого из вариантов 15-18 или 32-33 в целях приготовления лекарственного препарата для лечения и/или профилактики инфекции и/или заболевания, вызываемого вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).

### **Примеры**

#### **Пример 1: Конструирование последовательностей антигена оболочки ВИЧ**

[0229] Было разработано несколько последовательностей антигена оболочки ВИЧ, имеющих сходство с последовательностью мозаичного антигена ВИЧ mos2Env (SEQ ID NO: 6; ранее также описаного в WO 2010/059732). Вновь сконструированные мембраносвязанные последовательности были получены на основе (комбинации) полностью природных последовательностей дикого типа, происходящих от белков оболочки ВИЧ или химеры последовательности mos2Env и последовательностей белка оболочки ВИЧ дикого типа. Помимо полноразмерных последовательностей белка оболочки (см. Фиг. 1А) были также сконструированы последовательности, имеющие С-концевые усечения цитоплазматического домена (см., например, фиг. 1С). См. также, например, Schiernle et al., PNAS 1997; Abrahamyan et al., J. Virol 2005; Edwards et al., J. Virology, 2002, 76: 2683-2691. Растворимые варианты были также получены путем С-концевого усечения перед трансмембранной областью (TM), которая была заменена доменом тримеризации, таким как домен тримеризации GCN4 (см., например, фиг.1В). Эти растворимые варианты были затем превращены в одноцепочечный вариант путем мутации сайта расщепления фурином, что, таким образом, позволяет ингибировать процессинг внеклеточного домена белка оболочки в субъединицы gp120 и gp41.

[0230] Из всех сконструированных и протестированных конструкций, конструкции на основе С4 обладали наиболее оптимальными свойствами, например хорошими технологическими свойствами, укладкой, иммуногенностью и т.п., и эти конструкции были отобраны для дальнейших исследований. Был также получен растворимый вариант конструкции С4, имеющий домен тримеризации GCN4 вместо трансмембранного домена (sC4, фиг. 1В), и вариант, содержащий фрагмент из 7 аминокислот цитоплазматического домена (C4D7, фиг. 1С), и эти варианты были протестированы в последующих исследованиях. Аминокислотные последовательности С4, sC4 и C4D7 представлены в SEQ ID NO: 17, 19 и 18 соответственно. Кодированные их последовательности представлены в SEQ ID NO: 25, 27 и 26, соответственно. Конструкция С1 имеет последовательность внеклеточного домена на основе последовательности mos2Env (SEQ ID NO: 6). Были также получены растворимый вариант конструкции С1, имеющий домен тримеризации GCN4 вместо трансмембранного домена (sC1), и вариант, содержащий фрагмент из 7 аминокислот цитоплазматического домена (C1D7), подобный sC4 и C4D7, как показано на фиг. 1В и 1С, соответственно. Конструкция С1 и ее варианты были использованы в дальнейших исследованиях для сравнения, поскольку они, по существу, основаны на известной последовательности mos2Env. Аминокислотные последовательности С1, sC1 и C1D7 представлены в SEQ ID NO: 31, 30 и 32,

соответственно. Кодирующие их последовательности нуклеиновых кислот представлены в SEQ ID NO: 34, 33 и 35, соответственно. Другие конструкции, которые были протестированы, были менее оптимальными, чем конструкции на основе С4, и не были использованы в последующих экспериментах.

### **Пример 2: Экспрессия и укладка синтетических белков оболочки ВИЧ**

[0231] Были оценены уровень экспрессии, укладка и экспрессия синтетических белков оболочки ВИЧ на клеточной поверхности.

#### [0232] Уровни экспрессии

[0233] Клетки НЕК293F временно трансфицировали плазмидой, кодирующей растворимые синтетические белки оболочки ВИЧ sC1 и sC4, как описано в примере 1. Уровни экспрессии растворимого белка измеряли в супернатанте с использованием количественного Вестерн-блот-анализа (QWB). Результаты представлены на фиг. 2. Низкие уровни экспрессии для sC1 (который, по существу, соответствует mos2Env с добавлением трансмембранного домена) соответствуют недавно полученным авторами данным о mos2Env. Как показали результаты, вариант sC4 согласно изобретению имел значительно более высокие уровни экспрессии, чем вариант sC1 (контроль).

#### [0234] Укладка белка

[0235] Укладку белка тестировали путем оценки уровня связывания растворимых синтетических белков оболочки ВИЧ с антителом (MAb 17b), которое, как показал твердофазный иммуноферментный анализа (ELISA), связывается с сайтом связывания корцептора белка оболочки ВИЧ, который становится доступным только после связывания с CD4. В частности, очищенный sC4 тестировали на его связывание с MAb 17b в условиях предварительного связывания sC4 с CD4 и без предварительного связывания sC4 с CD4. Очищенный sC1 использовали в качестве контроля. Связывание MAb 17b с sC4 без предварительного связывания CD4 с белком оболочки является показателем наличия частично развернутого или предварительно инициированного белка оболочки (то есть, нестабильного Env, который принимает «открытую» конформацию в отсутствие связывания CD4). Результаты анализа ELISA показаны на фиг. 3А и 3В.

[0236] Как показано на фиг. 3В, sC4 обнаруживает сильное связывание с MAb 17b с предварительным связыванием с CD4, но не обнаруживает связывания с MAb 17b без предварительного связывания с CD4. В отличие от этого, как показано на фиг. 3А, sC1 обнаруживал гораздо более низкое связывание с MAb 17 в случае предварительного связывания с CD4 и без предварительного связывания с CD4. Эти результаты позволяют предположить, что sC4 имеет правильную укладку и не является доступным для сайта связывания корцептора до связывания с CD4.

[0237] Укладку белка также анализировали с помощью электрофореза в нативном полиакриламидном геле (ПААГ) для sC1 и sC4 в целях определения четвертичной структуры растворимых вариантов белка и, возможно, неправильного образования дисульфидного мостика между протомерами. После электрофореза в нативном геле, белок в геле детектировали с помощью вестерн-блот-анализа. Как показали результаты на фиг.



4, большинство sC4 присутствует в тримерном состоянии, которое является правильной четвертичной структурой.

[0238] В целом, результаты экспериментов по укладке белка продемонстрировали, что растворимый синтетический белок оболочки ВИЧ sC4 имеет желаемый профиль укладки, который улучшен по сравнению с профилем укладки уже существующего антигена mos2Env (представленного sC1).

#### [0239] Экспрессия на клеточной поверхности

[0240] Была также исследована экспрессия мембраносвязанных вариантов белков оболочки ВИЧ С1 (полноразмерного), С4 (полноразмерного, см. Фиг. 1А), С1D7 и С4D7 на клеточной поверхности. Клетки НЕК293Т временно трансфицировали только плазмидой, кодирующей eGFP (негативный контроль, NC), или плазмидой, кодирующей eGFP, вместе с экспрессионной конструкцией, кодирующей вариант белка оболочки ВИЧ. Через два дня после трансфекции, клетки подвергали анализу методом клеточного сортирования с активацией флуоресценции (FACS) на взаимодействие нескольких поликлональных и моноклональных антител, направленных против gp120, и «вторых» антител, а затем оценивали уровни экспрессии белка оболочки на клеточной поверхности. Качество вариантов оболочки оценивали путем определения общих уровней экспрессии с использованием поликлонального антитела против gp120 и путем оценки относительного связывания нейтрализующих антител PG9 и PG16 широкого спектра, которые связываются в зависимости от четвертичной структуры, и которые, предпочтительно, связываются с правильно уложенным тримером оболочки.

[0241] Результаты экспериментов по экспрессии на клеточной поверхности представлены на фиг. 5. Уровни поверхностной экспрессии усеченных вариантов С1D7 и С4D7 на клеточной поверхности, измеренные с использованием антитела против gp120, были намного выше, чем уровни экспрессии их полноразмерных аналогов, С1 и С4 на клеточной поверхности, соответственно. Это подтверждает, что делеция 144 остатков у карбокси-конца Env приводит к повышению уровней экспрессии белков оболочки на поверхности. Полноразмерная конструкция С4 согласно изобретению также обнаруживала повышенный уровень связывания с PG9 и PG16 по сравнению с полноразмерным С1, что позволяет предположить, что последовательность оболочки С4 имеет правильную укладку (то есть, тример) на поверхности клеток.

[0242] Эти результаты также продемонстрировали, что вариант С1D7, который, по существу, представляет собой Mos2Env с добавленным трансмембранным доменом и цитоплазматическим доменом из 7 аминокислот, может быть экспрессирован на поверхности клеток НЕК293Т. Это контрастирует с растворимой конструкцией в Ad26.mos2Env, которая не может быть экспрессирована на детектируемых уровнях на поверхности клеток при трансфекции в клетки А549. Тем не менее, относительное связывание с PG9 и PG16 едва различимо по сравнению с фоном, что позволяет предположить, что последовательность оболочки С1D7 имеет неправильную укладку и, вероятно, не присутствует в форме интактного тримера на поверхности клетки.

[0243] В целом, вариант оболочки C4D7 имеет наиболее оптимальный профиль связывания с антителом и экспрессирует gp120 на более высоком уровне, чем полноразмерный аналог C4, и связывается с PG9 и PG16 на уровне, который в 15 раз превышает уровень связывания с C1 и C1D7 (фиг. 5).

### **Пример 3: Стабильность векторов, кодирующих последовательности оболочки ВИЧ**

[0244] Ранее проведенные эксперименты в лабораториях авторов (не опубликованы) показали, что векторы аденовируса 26 (Ad26), кодирующие последовательность антигена mos2Env, обнаруживали относительно высокие отношения VP/IU (что указывает на более низкое качество партий аденовирусных продуктов) и, кроме того, такие векторы имеют низкую стабильность. В соответствии с этим, было важно протестировать стабильность синтетических белковых конструкций оболочки ВИЧ согласно изобретению в исходном аденовирусе.

[0245] Рекомбинантные векторы Ad26 (rAd26), кодирующие последовательности антигена ВИЧ C4, C4D7 и sC4 согласно изобретению, описанные выше в Примере 1, были получены в клетках PER.C6 (обозначаемых «rAd26.C4», «rAd26.C4D7» и «rAd26.sC4», соответственно). Векторные клоны (бляшки) были отобраны и масштабированы для получения исследуемых партий. Максимум 5 вирусных клонов (бляшек) были масштабированы по формату T25 и последовательно пересеяны за 10 пассажей в формате T25 (пассажи 1-3 представляют собой стадии трансфекции и очистки бляшек, а затем было проведено 10 пассажей в формате T25, и в целом было проведено 13 пассажей). Генетическую стабильность оценивали по числу пассажей вируса (vpn) 3, 5, 10 и 13 с помощью ПЦР-анализа трансгенного кластера E1 с последующим секвенированием после пассажа 13. Результаты показаны на фиг. 6.

[0246] Векторы rAd26, кодирующие полноразмерный C4 (rAd26.C4), имели плохие показатели размножения, как было определено по полному отсутствию цитопатогенного эффекта (CPE) в течение 2-3 дней, и генетическую нестабильность, как было определено по делециям в области трансгенного кластера E1; или их комбинации (фиг. 6). Из-за плохих показателей размножения и наблюдаемой генетической нестабильности, этот вектор, кодирующий полноразмерный C4, больше не использовался.

[0247] В противоположность этому, для векторов rAd26, кодирующих C4D7 (rAd26.C4D7) и sC4 (rAd26.sC4), все размноженные бляшки оставались генетически стабильными в течение всего эксперимента (фиг.6). Таким образом, новые конструкции sC4 и C4D7 превосходят исходную конструкцию mos2Env в отношении стабильности по сравнению с исходным аденовирусным вектором. Тестирование генетической стабильности до 13-го пассажа представляет собой несколько пассажей по размножению помимо пассажей, которые были проведены в случае получения векторов в промышленном масштабе.

### **Пример 4. Экспрессия и антигенность *in vivo* последовательностей оболочки ВИЧ в аденовирусных векторах**

[0248] Экспрессию и антигенность rAd26.C4D7 и rAd26.sC4 оценивали отдельно или в комбинации с рекомбинантным вектором Ad26, кодирующим mos1Env (SEQ ID NO: 5) (далее обозначаемым «rAd26.mos1Env») в клетках A549, трансдуцированных вектором (человеческая клеточная линия) *in vitro* (данные не приводятся). Анализ с помощью проточной цитометрии показал, что все антигены были экспрессированы в клеточных культурах, трансдуцированных либо  $2 \times 10^4$  вирусных частиц (ВЧ) одного антигена оболочки в качестве контроля, либо  $1 \times 10^4$  ВЧ двух комбинированных антигенов Env путем аденовирусной трансдукции. Все трансдукции дополнительно осуществляли с использованием однократных доз ( $1 \times 10^4$  ВЧ) аденовирусных векторов, кодирующих mos1GagPol («rAd26.mos1GagPol») и mos2GagPol («rAd26.mos2GagPol») (Barouch et al., Nat Med 2010, 16: 319-323), так, чтобы оцениваемые комбинации векторов имели такие же относительные отношения различных аденовирусных векторов, как и отношения для доклинического и клинического применения. Предпочтительно, чтобы векторы, кодирующие синтетические белки оболочки ВИЧ согласно изобретению, были объединены с векторами, кодирующими антигены mos1GagPol и mos2GagPol для клинического применения.

[0249] Комбинация rAd26.mos1Env и rAd26.C4D7 давала максимальный охват оцененных эпитопов, определяемый связыванием моноклональных антител. В частности, доступность эпитопа PG16, которая была сообщена путем трансформации Ad26.C4D7, является перспективной для ее использования в вакцинах, поскольку PG16 представляет собой нейтрализующее моноклональное антитело широкого спектра, распознающее область петли V1/V2 Env ВИЧ-1 (Walker et al, Science 326:258-9, 2009). Следовательно, синтетический белок оболочки ВИЧ согласно изобретению, происходящий от последовательности C4, увеличивает широту иммунного ответа против белка оболочки ВИЧ по сравнению с иммунным ответом, продуцируемым только mos1Env. Было показано, что индуцируемые вакциной гуморальные ответы, направленные на область белка оболочки, коррелируют с защитой от ВИЧ-1-инфекции в исследованиях RV144 (Haynes et al., N. Engl. J. Med. 336: 1275-86, 2012), и, таким образом, синтетический белок оболочки ВИЧ согласно изобретению является перспективным кандидатом на его включение в схемы вакцинации против ВИЧ.

**Пример 5: Иммуногенность векторов, кодирующих синтетические белки оболочки ВИЧ**

[0250] Последовательности синтетического белка оболочки ВИЧ согласно изобретению в исходном векторе Ad26 тестировали на кроликах, для того, чтобы определить, могут ли эти конструкции служить иммуногенной альтернативой конструкции rAd26.mos2Env.

[0251] Иммуногенность аденовирусного вектора, кодирующего mos1Env (rAd26.mos1Env; SEQ ID NO: 5), тестировали отдельно и в комбинации с аденовирусными векторами, кодирующими синтетические белки оболочки ВИЧ согласно изобретению (rAd26.C4D7 и rAd26.sC4, включающие SEQ ID NO: 8, а в частности SEQ ID NO: 18 и 19,

соответственно). Во всех случаях, также вводили векторы аденовируса 26, кодирующие антигены mos1GagPol и mos2GagPol (rAd26.mos1GagPol [SEQ ID NO: 28] и rAd26.mos2GagPol [SEQ ID NO: 29], соответственно). Более конкретно, иммуногенность одного rAd26.mos1Env (трехвалентной вакцины: rAd26.mos1GagPol, rAd26.mos2GagPol и rAd26.mos1Env) сравнивали с иммуногенностью rAd26.mos1Env в комбинации с одним из rAd26.C4D7 или rAd26.sC4 (четырёхвалентная вакцина: введение rAd26.mos1GagPol, rAd26.mos2GagPol, rAd26.mos1Env и rAd26.C4D7 или введение rAd26.mos1GagPol, rAd26.mos2GagPol, rAd26.mos1Env и rAd26.sC4). Это сравнение трехвалентной вакцины, в которой отсутствуют какие-либо векторы, кодирующие синтетические белки оболочки ВИЧ согласно изобретению, с четырехвалентной вакциной, которая содержит векторы, кодирующие синтетические белки оболочки ВИЧ согласно изобретению, позволяет определить вклад белков оболочки ВИЧ согласно изобретению в расширение спектра защиты.

[0252] Введение осуществляли по схемам вакцинации, где эти векторы Ad26 вводили на недели 0 и 6 для двойной инициации, а белок gp140 кладотипа С (трехвалентный белок gp140 Env, имеющий SEQ ID NO: 7, без последовательности сигнального пептида остатков 1-29, см. также WO 2010/042942) вводили на недели 12 и 18 для двойного бустер-эффекта (см., например, Barouch et al, 2015, Science 349: 320-324). В Таблице 1 описаны схемы вакцинации, используемые для текущего исследования. rAd26.Empty означает контрольный вектор, в котором отсутствует какой-либо ген, кодирующий последовательность антигенного белка ВИЧ. Каждая группа включала шесть кроликов.

**Таблица 1:** Схемы вакцинации, протестированные в исследованиях иммуногенности на кроликах

Группа	Первая и вторая иммунизация			Третья и четвертая иммунизация			N=
	Аденовирусные векторы	Доза (ВЧ)	Общая доза (ВЧ)	Бустер-доза белка	Доза (мкг)	Адьювант	
<b>1</b>	rAd26.Mos1Env	$2,5 \times 10^{10}$	$5 \times 10^{10}$	GP140 (кладотип С)	10	AdjuPhos 250 мкг	6
	rAd26.Mos1GagPol	$1,25 \times 10^{10}$					
	rAd26.Mos2GagPol	$1,25 \times 10^{10}$					
<b>2</b>	rAd26.Mos1Env	$1,25 \times 10^{10}$	$5 \times 10^{10}$	GP140 (кладотип С)	10	AdjuPhos 250 мкг	6
	rAd26.C4D7	$1,25 \times 10^{10}$					
	rAd26.Mos1GagP	$1,25 \times 10^{10}$					

	ol						
	rAd26.Mos2GagP	1,25×10 <sup>10</sup>					
	ol						
<b>3</b>	rAd26.Mos1Env	1,25×10 <sup>10</sup>	5×10 <sup>10</sup>	GP140 (кладотип С)	10	AdjuPhos 250 мкг	6
	rAd26.sC4	1,25×10 <sup>10</sup>					
	rAd26.Mos1GagPol	1,25×10 <sup>10</sup>					
	rAd26.Mos2GagPol	1,25×10 <sup>10</sup>					
<b>Контроль</b>	rAd26.Empty	5×10 <sup>10</sup>	5×10 <sup>10</sup>	NA	0	AdjuPhos 250 мкг	6

[0253] Сравнение трехвалентной вакцины Ad26 (без новых антигенов Env согласно изобретению) с четырехвалентной вакциной Ad26 (которая включает новые антигены sC4 или C4D7 Env) позволяет проверить, участвуют ли новые антигены согласно изобретению в расширении спектра защиты. Для оценки нейтрализующей активности вакцин-кандидатов был проведен уже разработанный анализ на нейтрализацию на основе клеток TZM-bl [Montefiori DC. *Methods Mol Biol* 2009, 485: 395-405; Sarzotti-Kelsoe M et al., *J. Immunol Methods* 2014, 409: 131-146].

[0254] Результаты показаны на фиг. 7 и были статистически проанализированы с использованием трехвалентной вакцины (группа 1 в Таблице 1) в качестве контрольной группы, и эти результаты сравнивали с результатами для каждой новой четырехвалентной вакцины (группы 2 и 3 в таблице 1).

[0255] В целом, новые аденовирусные конструкции, происходящие от C4 (то есть, кодирующие белки Env, содержащие SEQ ID NO: 8, которые являются альтернативой mos2Env), были иммуногенными после двух гомологичных внутримышечных иммунизаций у кроликов.

[0256] Нейтрализующая способность иммунной сыворотки кролика против псевдовирусов класса 1В отсутствовала (данные не приводятся), что не является неожиданностью, поскольку было известно, что такие вирусы труднее нейтрализовать.

[0257] Добавление новых компонентов не влияло на способность кроличьей иммунной сыворотки против вируса кладотипа В класса 1А нейтрализовать псевдовирс (данные не приводятся). Это свидетельствует о том, что новый антиген не оказывал негативного влияния на иммуногенность существующего антигена кладотипа В, присутствующего в вакцине (и хотя новые компоненты были направлены против кладотипа С, однако, такое нежелательное вмешательство нельзя было исключить a priori до его тестирования).

[0258] Способность кроличьей иммунной сыворотки против вируса кладотипа С класса 1А нейтрализовать псевдовирс значительно повышалась после иммунизации четырехвалентной новой вакциной C4D7, содержащей аденовирус (четырёхвалентный, группа 2), по сравнению с иммунизацией только трехвалентной вакциной (имеющей

только mos1Env) (группа 1) (фиг. 7, панель В). Кроме того, способность кроличьей иммунной сыворотки против вируса кладотипа С класса 1А на неделю 8 нейтрализовать псевдовирус значительно повышалась после иммунизации четырехвалентной новой вакциной sC4, содержащей аденовирус (четырёхвалентный, группа 3), по сравнению с иммунизацией только трехвалентной вакциной (имеющей только mos1Env) (группа 1) (фиг. 7, панель В).

[0259] В заключение следует отметить, что, конструкции C4D7 и sC4, кодируемые в Ad26, были иммуногенными, и их добавление увеличивало способность к связыванию и нейтрализации вакцины, в которой mos1Env (в основном, кладотипа В) является единственным компонентом Env, кодируемым Ad26, по отношению к штаммам кладотипа С (фиг. 7В)

**Пример 6: Иммуногенность вакцин в схемах вакцинации, включающих векторы, кодирующие синтетические белки оболочки ВИЧ согласно изобретению**

[0260] В еще одном исследовании на кроликах оценивали комбинацию четырехвалентного вектора Ad26.Mos4.HIV (состоящую из четырех аденовирусных векторов: Ad26.Mos1GagPol [кодирующего SEQ ID NO: 28], Ad26.Mos2GagPol [кодирующего SEQ ID NO: 29], Ad26. Mos1Env [кодирующего SEQ ID NO: 5] и Ad26.Mos2SEnv [обозначенного «C4D7» и используемого выше, а также упоминаемого здесь как «Mos2S»; этот вектор кодирует новую SEQ ID NO: 18 согласно изобретению] в смеси 1:1:1:1 в общей дозе  $5 \times 10^9$  ВЧ), вводимую внутримышечно по схеме двойной первичной иммунизации на недели 0 и 6, в комбинации с рекомбинантным белком Env ВИЧ-1 для достижения бустер-эффекта с использованием gp140 кладотипа С [имеющего последовательность аминокислотных остатков 30-708 SEQ ID NO: 7], мозаичного gp140 [имеющего последовательность аминокислотных остатков 30-724 SEQ ID NO: 36] или комбинации gp140 кладотипа С и мозаичного gp140 на недели 13 и 19. Эти белки давали бустер-эффект при внутримышечном введении в общей дозе 10 или 50 микрограммов белка в комбинации с 250 микрограммами адьюванта на основе фосфата алюминия в день иммунизации.

[0261] Результаты показали, что все протестированные схемы были иммуногенными у всех животных, давали высокие титры антител и обладали умеренной нейтрализующей активностью против псевдотипированных вирусов Env класса 1. Если мозаичный gp140 использовали в качестве вакцинного антигена, либо отдельно, либо в комбинации с gp140 кладотипа С, то ELISA-титры антител, специфичных к мозаичному gp140, и распознавание псевдовируса кладотипа В значительно повышались на неделю 15 по сравнению с контрольной группой, которой вводили бустер-дозу только gp140 кладотипа С. Общий эффект такого улучшения был умеренным и был выше для группы, получавшей бустер-дозу комбинации двухвалентного gp140 кладотипа С - мозаичного gp140 по сравнению с эффектом после введения только мозаичного gp140. На неделе исследования 21, эти различия были утрачены, и иммунные ответы, оцениваемые для групп, которым вводили бустер-дозы комбинации двухвалентного gp140 кладотипа С -

мозаичного gp140 или бустер-дозы одновалентного gp140 кладотипа С, были статистически неразличимыми.

[0262] Схема введения двухвалентного белка показала сравнимое индуцирование ELISA-титров для кладотипа С и распознавание псевдовируса после введения бустер-дозы только gp140 кладотипа С, что указывает на то, что включение мозаичного иммуногена gp140, родственного кладотипу В, не оказывало негативного влияния на охват антигенов кладотипа С, но в то же время значительно повышало охват кладотипов В на неделю исследования 15.

[0263] Данные подтвердили, что вектор Ad26.Mos2SEnv, кодирующий синтетический антиген Env согласно изобретению, может быть с успехом использован в схемах вакцинации.

**Пример 7. Конструирование векторов MVA, кодирующих синтетические белки оболочки ВИЧ согласно изобретению в комбинации с другими антигенами ВИЧ.**

[0264] Как описано в настоящем примере, был создан вектор MVA-BN (обозначенный «MVA-mBN414»), содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую новый антиген ВИЧ mos2SEnv, описанный здесь как SEQ ID NO: 18 (также называемый C4D7). Вектор MVA-mBN414 дополнительно содержал нуклеиновые кислоты, кодирующие следующие антигены ВИЧ: mos1Env (SEQ ID NO: 5); mos1Gag (SEQ ID NO: 1); mos2Gag (SEQ ID NO: 2); mos1Pol (SEQ ID NO: 3); и mos2Pol (SEQ ID NO: 4). В MVA-mBN414, mos1Gag (SEQ ID NO: 1) и mos1Pol (SEQ ID NO: 3) кодировались как гибридный белок (SEQ ID NO: 28, «mos1GagPol»), и mos2Gag и mos2Pol кодировались как гибридный белок (SEQ ID NO: 29, «mos2GagPol»). См. Фиг. 8, где схематически представлены вставки в области генома MVA.

[0265] Авторами была сконструирована новая нуклеиновая кислота (SEQ ID NO: 41), кодирующая антиген mos2SEnv ВИЧ (SEQ ID NO: 18); новая нуклеиновая кислота (SEQ ID NO: 39), кодирующая антиген mos1Env ВИЧ (SEQ ID NO: 5); новая нуклеиновая кислота (SEQ ID NO: 38), кодирующая антиген mos1GagPol ВИЧ (SEQ ID NO: 28); и новая нуклеиновая кислота (SEQ ID NO: 40), кодирующая антиген mos2GagPol ВИЧ (SEQ ID NO: 29). Новые нуклеиновые кислоты были сконструированы для экспрессии у человека, имели минимальную гомологию и имели меньшие по размеру полинуклеотидные фрагменты, а также повторяющиеся элементы.

[0266] Длинный промотор PrMVA13.5 (SEQ ID NO: 42) был включен перед старт-кодоном ATG последовательностей антигенов mos1GagPol и mos2GagPol. Промотор PrHyb (SEQ ID NO: 43) был включен перед старт-кодоном ATG последовательностей антигенов mos2SEnv и mos1Env.

[0267] Кодирующие последовательности mos1GagPol и mos1Env были встроены посредством SacII и PacI в pBNX208, то есть, в вектор для переноса, кодирующий гомологичные области IGR 44/45 MVA-BN, что позволяет осуществлять встраивание в область-мишень (IGR 44/45) MVA-BN посредством гомологичной рекомбинации. Более

того, pBNX208 кодирует heGFP и nptII для позитивного отбора, а также повторяющиеся последовательности гомологичной области IGR 44/45 MVA-BN Flank 2 или для более позднего вырезания селективного кластера посредством гомологичной рекомбинации в отсутствие давления отбора. Кодирующие последовательности mos2GagPol и mos2Env были встроены посредством NotI в pBNX227, в вектор для переноса, кодирующий гомологичные области IGR88/89 MVA-BN, что позволяет осуществлять встраивание в область-мишень (IGR 88/89) MVA-BN посредством гомологичной рекомбинации. Кроме того, pBNX227 кодирует mRFP1 и esogpt для позитивного отбора, которые фланкируются двумя сайтами loxP для последующего вырезания селективного кластера в отсутствие давления отбора после трансфекции плазмидой, кодирующей CRE-рекомбиназу, которая катализирует точное вырезание последовательностей нуклеиновой кислоты, фланкированных последовательностью-мишенью loxP.

[0268] Векторы на основе MVA были получены в первичных куриных фибробластах (CEF), как описано в настоящей заявке. Клетки CEF еженедельно выделяли из куриных эмбрионов и хранили в среде VP-SFM без FBS. Вкратце, клетки CEF трансфецировали плазмидным вектором MVA с использованием Fugene в соответствии с инструкциями, предоставленными производителем (Promega), и проводили коинфицирование MVA-BN. Клетки собирали через два или три дня, обрабатывали ультразвуком и затем подвергали пассированию. Вирус очищали методом блюшек в клетках CEF, культивированных в многолуночном 96-луночном планшете для культивирования тканей, после амплификации в одной лунке многолуночного 12-луночного планшета для культивирования тканей. Дальнейшую амплификацию проводили в клетках CEF, культивированных в одной лунке многолуночного 6-луночного планшета для культивирования тканей, а затем в колбе для тканевой культуры T175.

[0269] Таким образом, MVA-mBN414 представляет собой MVA-BN, содержащий в своей области IGR 44/45 нуклеиновую кислоту, кодирующую mos1GagPol (SEQ ID NO: 28), под контролем длинного промотора PrMVA13.5 (SEQ ID NO: 42), и нуклеиновую кислоту, кодирующую mos1Env (SEQ ID NO: 5), под контролем промотора PrHyb (SEQ ID NO: 43). В области IGR 88/89 присутствует нуклеиновая кислота, кодирующая mos2GagPol (SEQ ID NO: 29), под контролем длинного промотора PrMVA13.5l (SEQ ID NO: 42), и нуклеиновая кислота, кодирующая mos2SEnv (SEQ ID NO: 18), под контролем промотора PrHyb (SEQ ID NO: 43). Вектор MVA-mBN414 использовали в последующих экспериментах в схемах «прайм-буст» вместе с аденовирусными векторами, кодирующими описанные здесь антигены.

#### **Пример 8: Иммуногенность MVA-mBN414 у кроликов**

[0270] Иммуногенность MVA-mBN414 (см. Пример 7) у новозеландских белых (NZW) кроликов оценивали в присутствии Ad26.Mos.HIV (трехвалентной вакцины, имеющей 3 вектора Ad26, которые вместе кодируют антигены ВИЧ, имеющие SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 4 и 5, в форме антигенов mos1GagPol (SEQ ID NO: 28), mos2GagPol (SEQ ID NO: 29) и mos1Env (SEQ ID NO: 5)), вводимого для первичной иммунизации, и



сравнивали с гомологичным Ad26.Mos.HIV, вводимым по схеме прайм-буст. Кроме того, было оценено дополнительное преимущество совместного применения белка gp140 кладотипа С (с добавлением фосфата алюминия в качестве адьюванта) на дни 42 и 62 (путем инъекции в контралатеральные мышцы (то есть, в отдельные конечности)).

[0271] Используемая схема иммунизации представлена ниже в Таблице 2:

**Таблица 2:** Схема иммунизации для исследования иммуногенности у кроликов.

Группа	День иммунизации 0+22	День иммунизации 43+64	N (самка)	N (самец)
1	Ad26.Mos.HIV $5 \times 10^{10}$ ВЧ	Ad26.Mos.HIV $5 \times 10^{10}$ ВЧ	7	7
2		MVA-mBN414 $1,8 \times 10^8$ TCID <sub>50</sub>	7	7
3		MVA-mBN414 $1,8 \times 10^8$ TCID <sub>50</sub> +gp140 кладотипа С 250 мкг в AdjuPhos® 425 мкг	7	7
4	Ad26.Mos.HIV $5 \times 10^9$ ВЧ	MVA-mBN414 $1,8 \times 10^7$ TCID <sub>50</sub> +gp140 кладотипа С 25 мкг в AdjuPhos® 42,5 мкг	7	7
5	Ad26.Empty $5 \times 10^{10}$ ВЧ	BN-MVA.Empty $1,8 \times 10^8$ TCID <sub>50</sub>	3	3

[0272] Анализы результатов считывания представляют собой ELISA-анализ на кладотип С (остатки 30-708 SEQ ID NO: 7) и мозаичный gp140 (остатки 30-724 SEQ ID NO: 36) и анализ на нейтрализацию псевдовируса ВИЧ-1. Нейтрализующую способность сыворотки иммунизированных кроликов тестировали против частиц псевдотипированного вируса ENV ВИЧ-1 (EPV) по ингибированию проникновения вируса в клетки TZM-bl. Клетки TZM-bl экспрессируют высокие уровни CD4 и корецепторов CCR5 и CXCR4 и содержат интегрированный tat-чувствительный репортерный ген люциферазы под контролем длинной концевой повторяющейся последовательности ВИЧ. Нейтрализующий эффект сывороточных антител против EPV Env ВИЧ-1 приводит к снижению экспрессии люциферазы и, следовательно, к снижению люминесцентного сигнала в комбинации с субстратом, содержащим люциферин. Сыворотку или антитела тестировали при трехкратном серийном разведении за 6 стадий, начиная с разведения 1/20. Максимальную экспрессию люциферазы измеряли путем добавления только клеток+EPV в одну лунку без сыворотки или антител. Фооновую экспрессию люциферазы измеряли путем добавления в лунку только клеток без сыворотки/антител и EPV. Была построена нелинейная 4-параметрическая кривая по данным максимального и фонового люциферазного сигнала, и log<sub>10</sub>-трансформированные значения IC<sub>50</sub> были определены

как отчетные значения.

[0273] Результаты представлены на фиг. 9.

[0274] Результаты показали, что MVA-mBN414 был иммуногенным у всех кроликов. Какого-либо явного различия в иммуногенности между самцами и самками животных не наблюдалось. Бустер-доза MVA вместе с первичной дозой Ad26 индуцировали увеличение ВИЧ-специфического гуморального иммунного ответа (измеряемого в ELISA на кладотип С, ELISA на мозаичный вирус, подобный вирусу кладотипа В, и в VNA на кладотип В) по сравнению с прайм-буст-введением гомологичного Ad26.

[0275] Совместное введение белка gp140 кладотипа С с MVA в бустер-дозе приводило к увеличению титров в ELISA-анализе на gp140 кладотипа С (гомологичный) и в ELISA-анализе на мозаичный gp140 (гетерологичный) по сравнению с бустер-дозой только с MVA.

#### **Пример 9. Иммуногенность MVA-mBN414 у мышей.**

[0276] Иммуногенность MVA-mBN414 также оценивали на мышах CBF1 для определения иммуногенности гетерологичного Ad26.Mos4.HIV (см. Пример 6) после первичной иммунизации и после бустер-иммунизации MVA-mBN414 (см. Пример 7) по сравнению с прайм-буст-введением гомологичного MVA (то есть, первичной иммунизации и бустер-иммунизации вместе с MVA-mBN414).

[0277] Используемая схема иммунизации приводится ниже в Таблице 3:

Таблица 3: Схема иммунизации для исследования иммуногенности на кроликах

Группа	Неделя 0		Неделя 5		N=
	Тестируемый продукт:	Доза:	Тестируемый продукт	Доза:	
1	Ad26.Mos4.HI V	Всего $2,5 \times 10^9$ ВЧ	MVA-mBN414	$2,8 \times 10^6$ TCID <sub>50</sub>	7
2		Всего $2,5 \times 10^8$ ВЧ		$2,8 \times 10^5$ TCID <sub>50</sub>	7
3	MVA- mBN414	$2,8 \times 10^6$ TCID <sub>50</sub>	MVA-mBN414	$2,8 \times 10^6$ TCID <sub>50</sub>	7
4		$2,8 \times 10^5$ TCID <sub>50</sub>		$2,8 \times 10^5$ TCID <sub>50</sub>	7
5	Ad26.Empty	Всего $2 \times 10^9$ ВЧ	MVA-BN- empty	$2,8 \times 10^6$ TCID <sub>50</sub>	5

[0278] Анализы данных считывания для гуморальных иммунных ответов (оценка антиген-специфического IgG на недели 5 и 7) представляют собой ELISA-анализ на мозаичный gp140 (остатки 30-724 SEQ ID NO: 36) (см. Пример 8). Анализ данных считывания для клеточных иммунных ответов (на неделю 7) представляет собой ELISPOT на IFN- $\gamma$  (анализ, описанный Khan et al., Int. J. Cancer, 2017, Mar 6, doi: 10.1002/ijc.30679. [Epub готовится к печати]; 2017, Jul 14, 141(2), 393-404) с использованием иммунодоминантных пептидов Env, Gag и Pol в качестве стимуляторов.

[0279] Результаты ELISPOT показаны на фиг. 10. Был также проведен анализ на

внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS), который дал аналогичные результаты (не приводятся).

[0280] Результаты показали, что первичная иммунизация Ad26 или MVA индуцировала детектируемые иммунные ответы на неделю 5 (фиг. 10A), которые еще усиливались после бустер-иммунизации MVA на 7-й неделе (фиг. 10B), проводимой по схеме введения гетерологичного Ad-MVA и гомологичного MVA-MVA. Прайм-буст-иммунизация гетерологичным Ad-MVA давала значительно более высокие титры ELISA, чем прайм-буст-иммунизация гомологичным MVA-MVA. Это также наблюдалось для клеточных иммунных ответов, измеренных с помощью анализа ELISPOT против антигенов Env, Gag и Pol на неделю 7 (фиг. 10C-E). Прайм-буст-иммунизация гомологичным MVA индуцировала низкий, но детектируемый клеточный иммунный ответ против антигенов Gag и Pol, который заметно отличался от данных для контроля.

[0281] В целом, результаты показали, что MVA с антигенами ВИЧ согласно изобретению является иммуногенным. Кроме того, было показано, что такой вектор может преимущественно использоваться в схемах прайм-буст-иммунизации аденовирусными векторами, кодирующими антигены ВИЧ, и/или выделенными белками gp140 ВИЧ.

### **Библиография**

1. Barouch et al. Nat Med 2010, 16: 319-323
2. WO 2010/059732
3. Schiernle et al., PNAS 94: 8640-8645, 1997
4. Abrahamyan et al., J Virol 79: 106-115, 2005
5. US20120076812
6. Barouch et al., Cell 155: 1-9, 2013
7. Havenga, et al. 2006, J Gen Virol 87: 2135-43;
8. WO 03/104467
9. WO 2004/001032
10. WO 2007/104792
11. Abbink et al, (2007) Virol 81(9): 4654-63
12. Патент США No. 7270811
13. Vogels et al., (2003) J Virol 77(15): 8263-71
14. WO 00/70071
15. WO2012/082918
16. Walker LM, Phogat SK, Chan-Hui PY, Wagner D, Phung P, Goss JL, et al., Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. Science 2009, **326**:285-289.
17. Haynes BF, Gilbert PB, McElrath MJ, Zolla-Pazner S, Tomaras GD, Alam SM, et al., Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. N. Engl. J Med 2012, **366**: 1275-1286.
18. Barouch et al. (2015). Science 349: 320-324

19. Montefiori DC. Measuring HIV neutralization in a luciferase reporter gene assay. *Methods Mol Biol* 2009, **485**:395-405.
20. Sarzotti-Kelsoe M, Bailer RT, Turk E, Lin CL, Bilaska M, Greene KM, et al., Optimization and validation of the TZM-bl assay for standardized assessments of neutralizing antibodies against HIV-1. *J. Immunol Methods* 2014, **409**: 131-146.
21. Edwards et al. *J. Virology*, 2002, 76:2683-2691.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Поксвирусный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую:
  - (a) первый антиген оболочки ВИЧ (Env), содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18;
  - (b) второй антиген Env ВИЧ, отличающийся от первого антигена Env ВИЧ;
  - (c) третий антиген и четвертый антиген, которые представляют собой два различных антигена Gag ВИЧ; и
  - (d) пятый антиген и шестой антиген, которые представляют собой два различных антигена Pol ВИЧ.
2. Поксвирусный вектор по п. 1, где второй антиген Env ВИЧ содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; третий и четвертый антигены содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, соответственно; и пятый и шестой антигены содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, соответственно.
3. Поксвирусный вектор по п.1 или 2, где третий и пятый антигены вместе образуют первый гибридный антиген Gag-Pol, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 28; а четвертый и шестой антигены вместе образуют второй гибридный антиген Gag-Pol, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 29.
4. Поксвирусный вектор по любому из пп. 1-3, где первый антиген Env ВИЧ кодируется SEQ ID NO: 41.
5. Поксвирусный вектор по п.3, где первый антиген Env ВИЧ кодируется SEQ ID NO: 41; второй антиген Env ВИЧ кодируется SEQ ID NO: 39; первый гибридный антиген Gag-Pol кодируется SEQ ID NO: 38; и второй гибридный антиген Gag-Pol кодируется SEQ ID NO: 40.
6. Поксвирусный вектор по любому из пп. 1-5, где поксвирусный вектор представляет собой рекомбинантный вектор модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA).
7. Поксвирусный вектор по п.6, где вектор MVA содержит MVA-BN или его производные.
8. Поксвирусный вектор по п. 6 или 7, где первый гибридный антиген Gag-Pol и второй антиген Env встроены в межгенную область (IGR) 44/45 генома MVA, а второй гибридный антиген Gag-Pol и первый антиген Env встроены в IGR 88/89 генома MVA.
9. Поксвирусный вектор по любому из п.п. 6-8, где каждый из первого гибридного антигена Gag-Pol и второго гибридного антигена Gag-Pol находится под контролем отдельного промотора Pr13.5, и каждый из первого антигена Env и второго антигена Env находится под контролем отдельного промотора PrHub.

10. Вакцина, содержащая поксвирусный вектор по любому из пп. 1-9 и фармацевтически приемлемый носитель.

11. Вакцинная комбинация, включающая:

(а) первую вакцинную композицию, содержащую иммунологически эффективное количество поксвирусного вектора по любому из п.п. 1-9; и по меньшей мере одну из:

(b) (i) второй вакцинной композиции, содержащей иммуногенно эффективное количество одного или нескольких аденовирусных векторов, кодирующих один или более из первого, второго, третьего, четвертого, пятого и шестого антигенов; и

(b) (ii) третьей вакцинной композиции, включающей один или более полипептидов, содержащих иммуногенно эффективное количество выделенного антигенного полипептида ВИЧ,

где первая композиция и вторая и/или третья композиция присутствуют в одной и той же композиции или в одной или более различных композициях.

12. Вакцинная комбинация по п. 11, где вторая вакцинная композиция содержит рекомбинантные векторы Ad26, которые вместе кодируют SEQ ID NO: 18, 5, 1, 2, 3 и 4.

13. Вакцинная комбинация по п.п. 11 или 12, где один или более выделенных антигенных полипептидов ВИЧ в третьей вакцинной композиции включают:

(i) полипептид, содержащий остатки 30-708 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, или

(ii) полипептид, содержащий остатки 30-724 SEQ ID NO: 36; или

(iii) оба полипептида (i) и (ii).

14. Способ индукции иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) у пациента, включающий введение пациенту вакцины по п. 10 или вакцинной комбинации по любому из п.п. 11-13.

15. Способ индукции иммунного ответа против вируса иммунодефицита человека у пациента, включающий введение пациенту:

(а) первой вакцины, содержащей один или более рекомбинантных аденовирусных векторов, предпочтительно векторов Ad26, кодирующих один или более из SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 и 18; и

(b) второй вакцины, содержащей поксвирусный вектор по любому из пп.1-9, где первая вакцина представляет собой примирующую вакцину, а вторая вакцина представляет собой бустер-вакцину, или где вторая вакцина представляет собой примирующую вакцину, а первая вакцина представляет собой бустер-вакцину.

16. Способ по п. 15, дополнительно включающий введение пациенту одного или более выделенных антигенных полипептидов ВИЧ приблизительно одновременно с бустер-вакциной, где один или более антигенных полипептидов ВИЧ предпочтительно включают:

(i) полипептид, содержащий остатки 30-708 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, или

(ii) полипептид, содержащий остатки 30-724 SEQ ID NO: 36; или

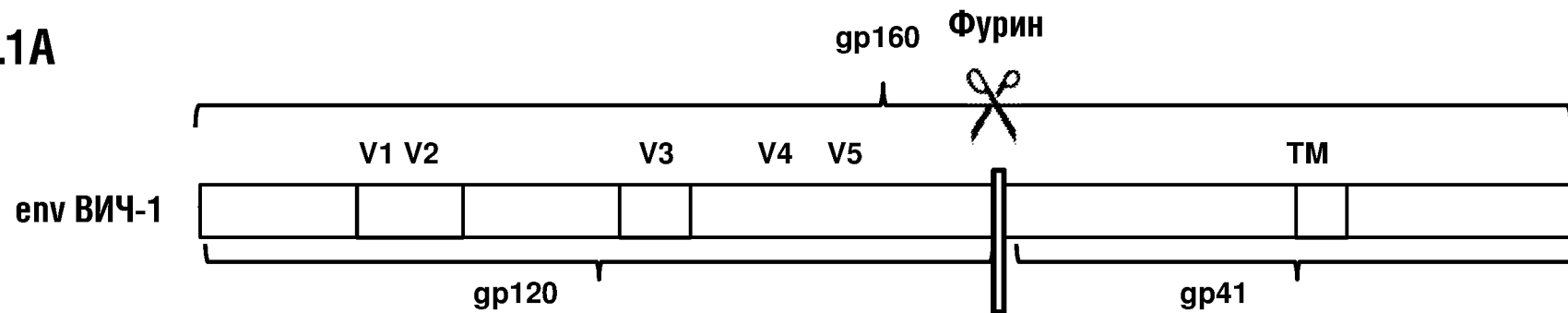
(iii) оба полипептида (i) и (ii),

и где один или более выделенных антигенных полипептидов ВИЧ присутствуют в одной и той же композиции в виде бустер-вакцины, или в виде отдельной композиции, не являющийся бустер-вакциной.

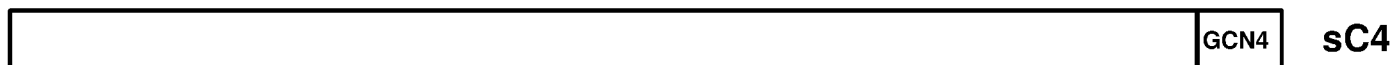
17. Способ по любому из п.п. 14-16, где пациентом является пациент, который был инфицирован ВИЧ.

По доверенности

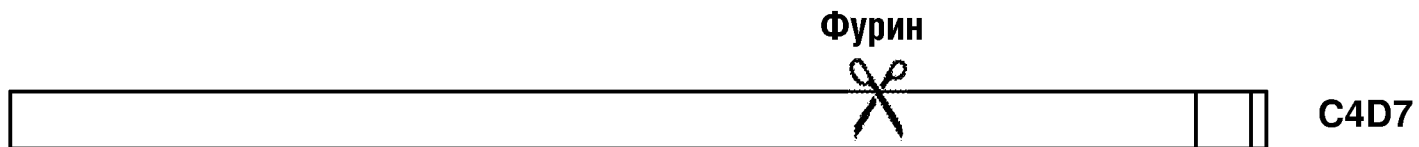
**ФИГ.1А**



**ФИГ.1В**

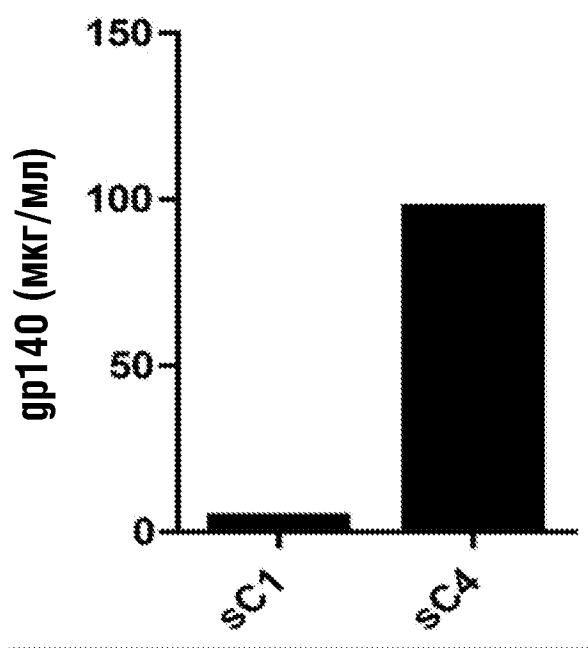


**ФИГ.1С**

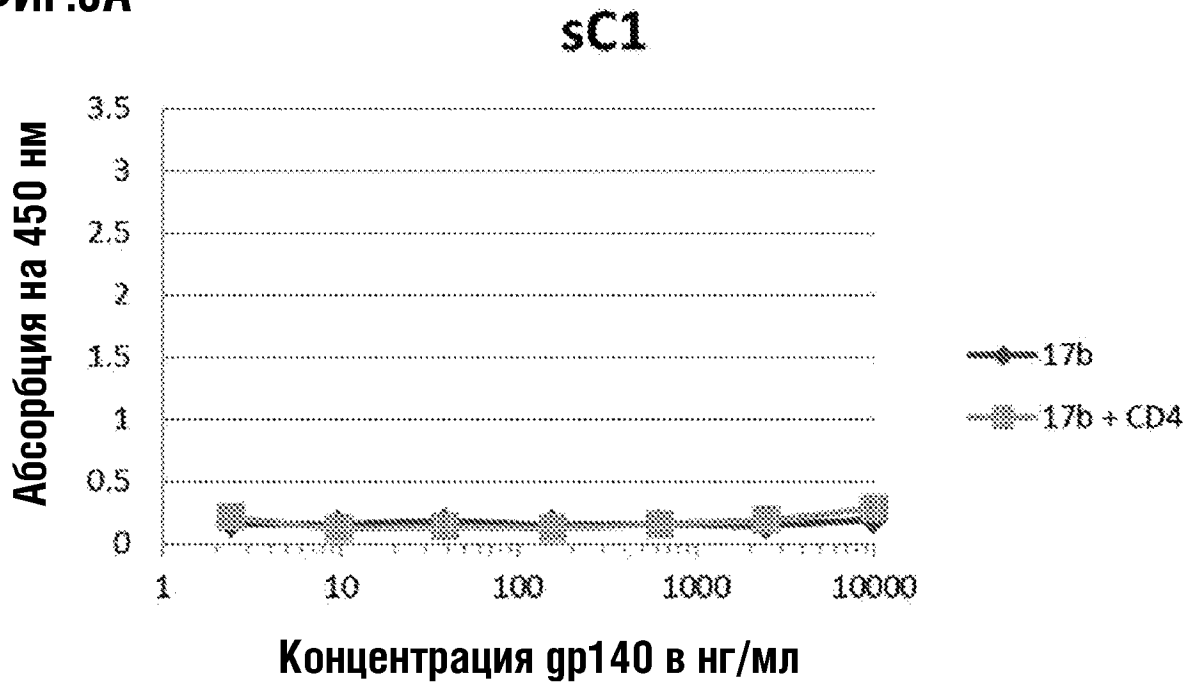




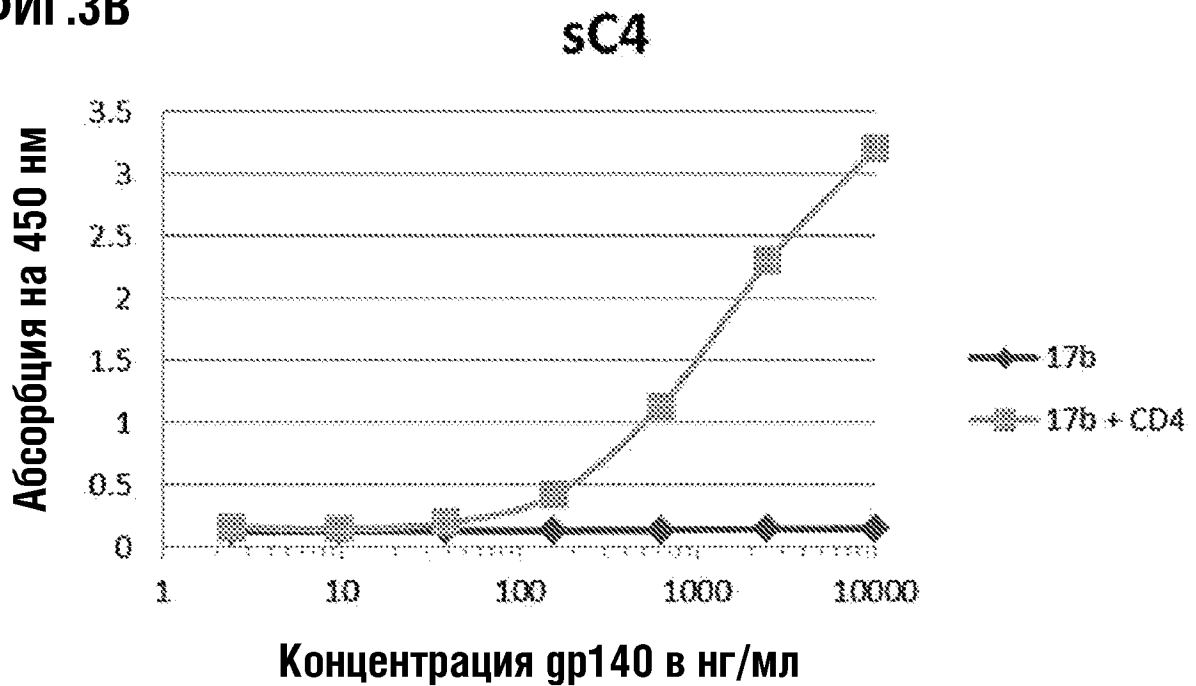
ФИГ.2



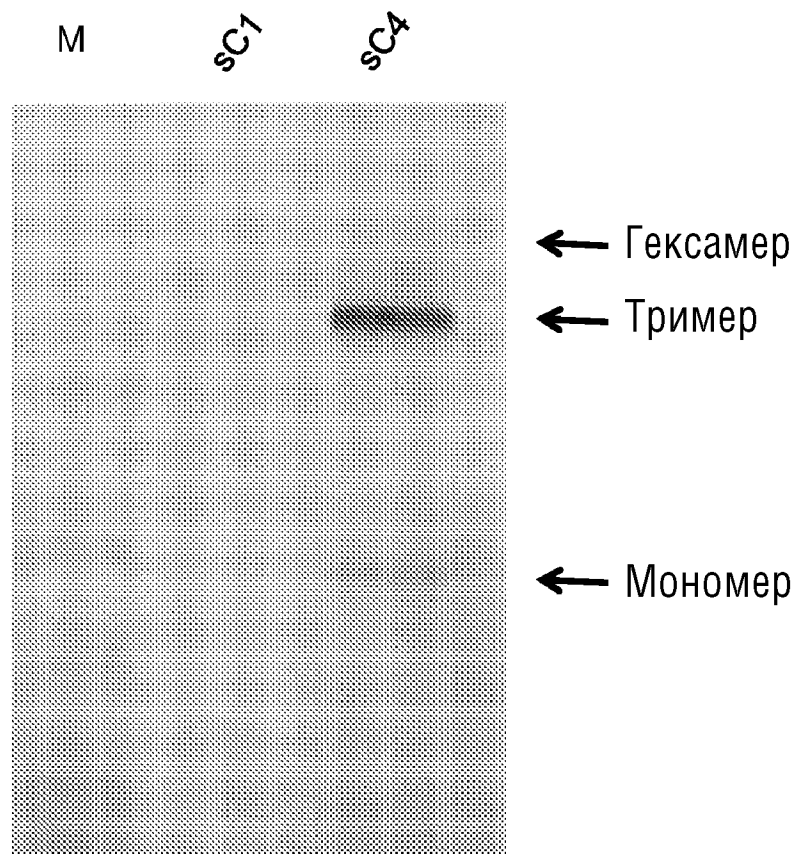
ФИГ.3А



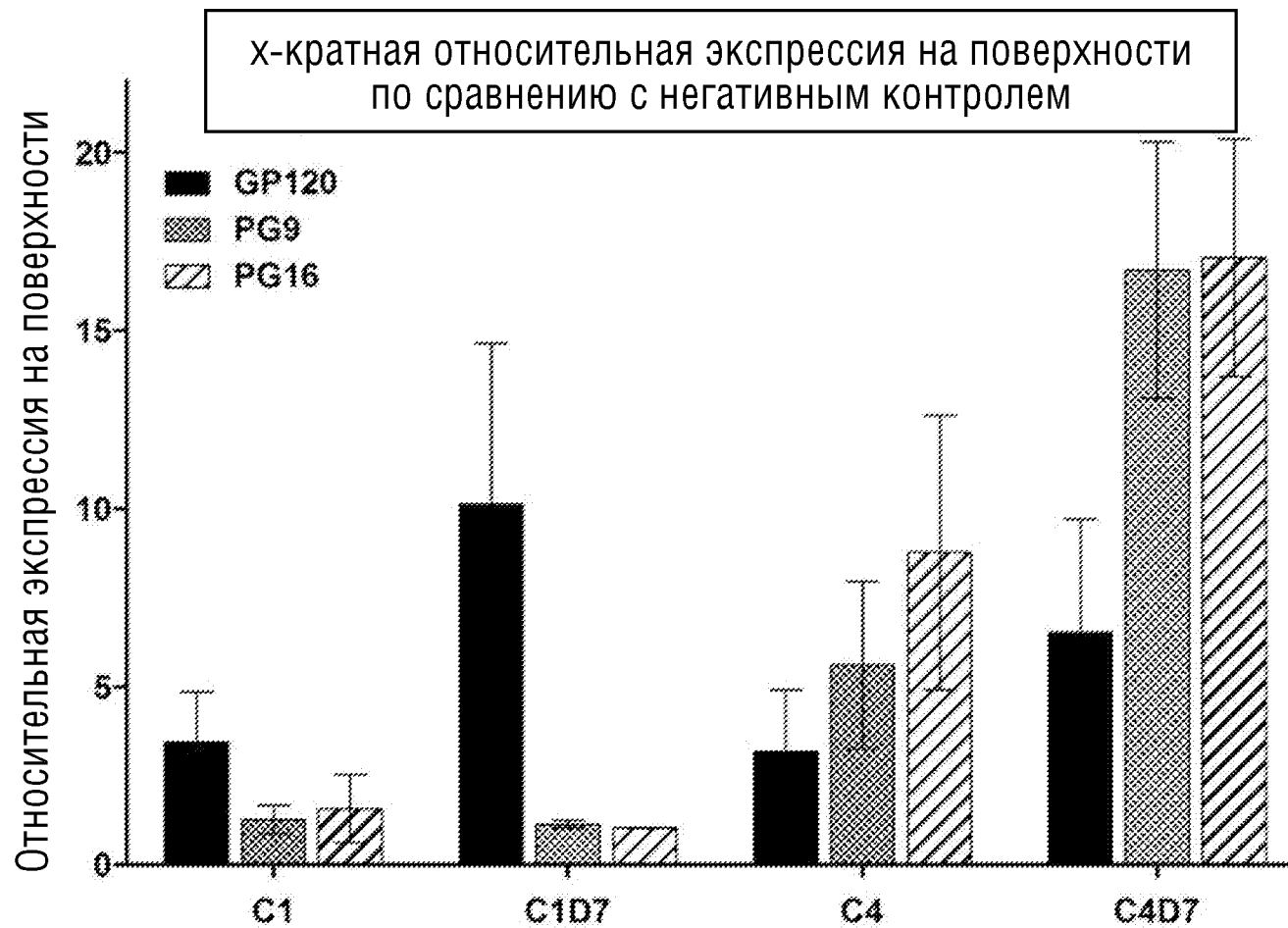
ФИГ.3В



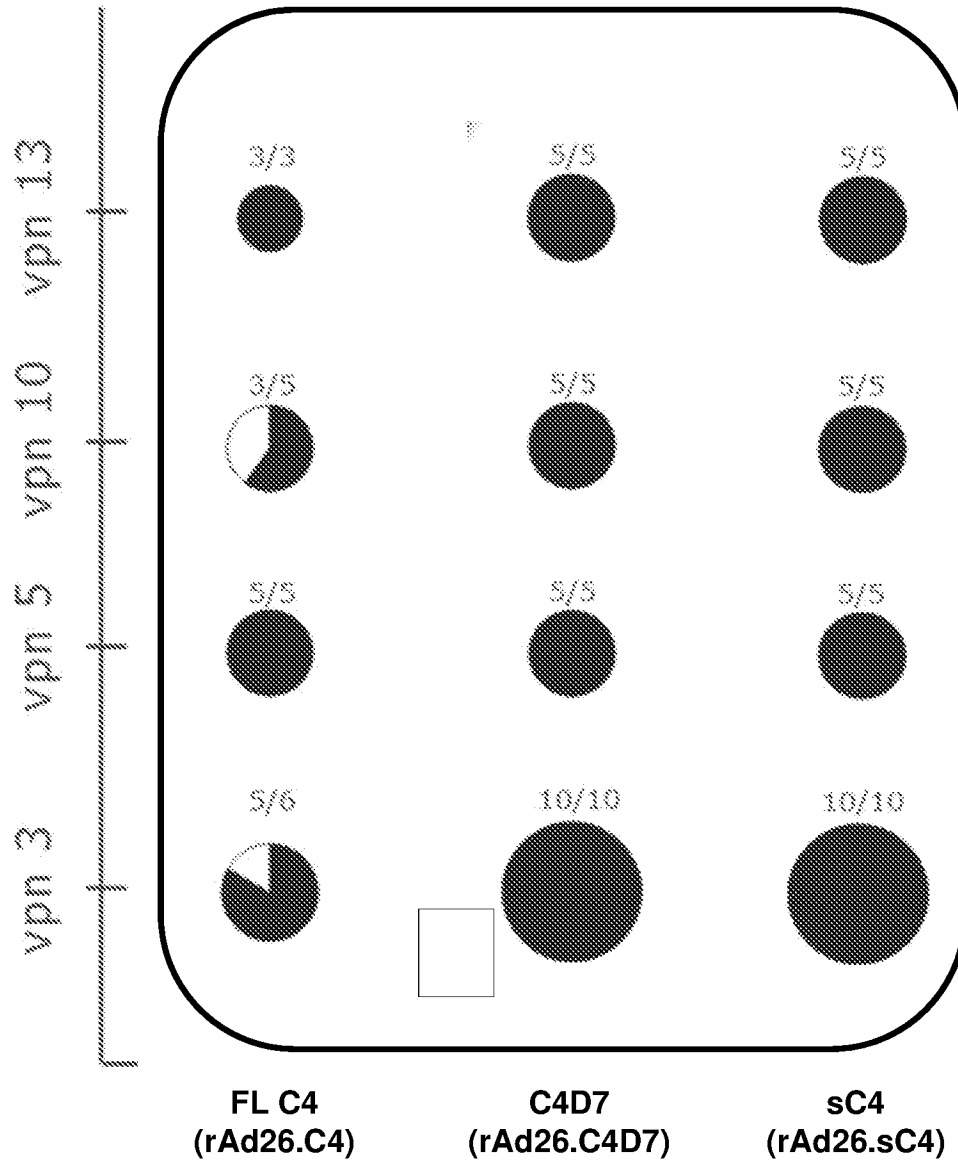
ФИГ.4



ФИГ.5

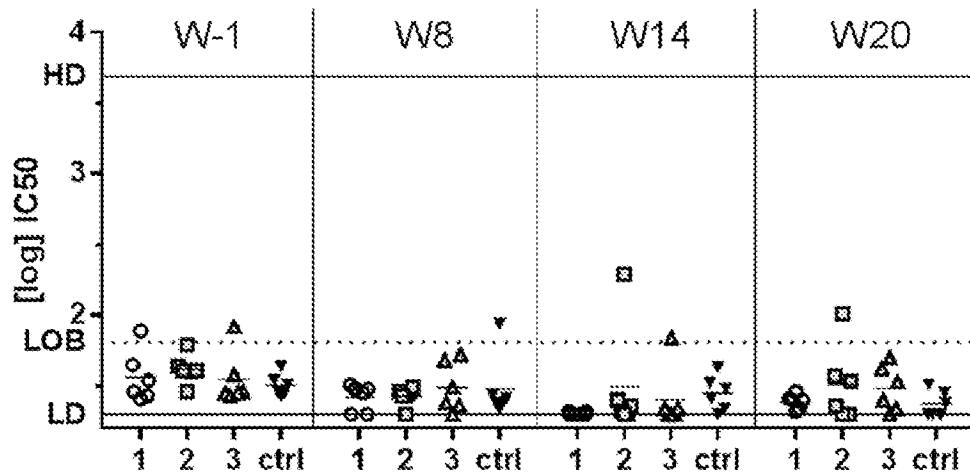


ФИГ.6



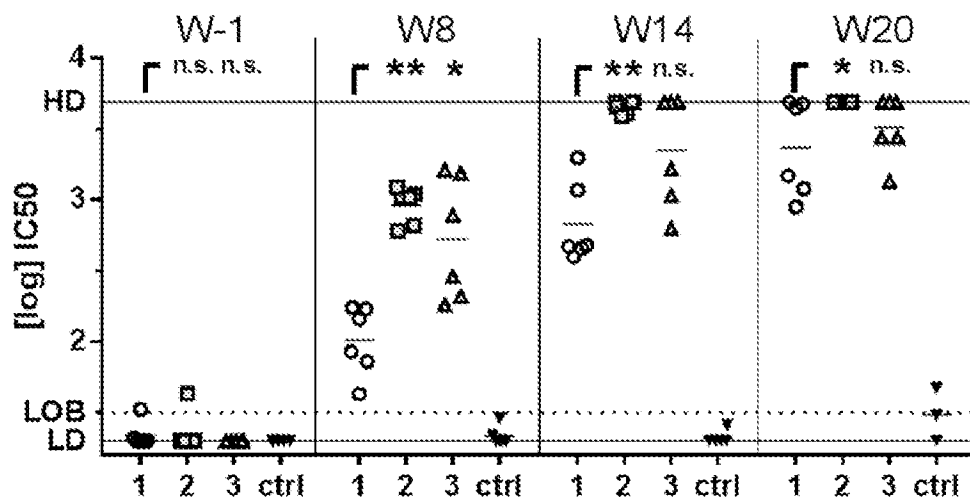
ФИГ.7А

## Негативный контроль VSV-G



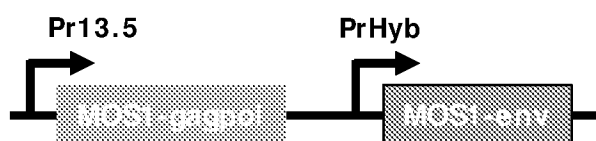
ФИГ.7В

## MW965.26, Класс 1А, кладотип С

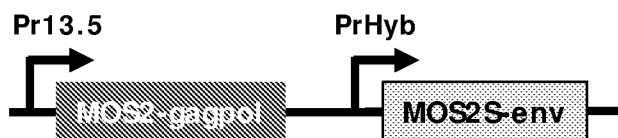


- 3-валентная
- 4-валентная (C4D7)
- ▲ 4-валентная (sC4)
- ▼ контроль (Ad26.Empty)

**ФИГ.8**

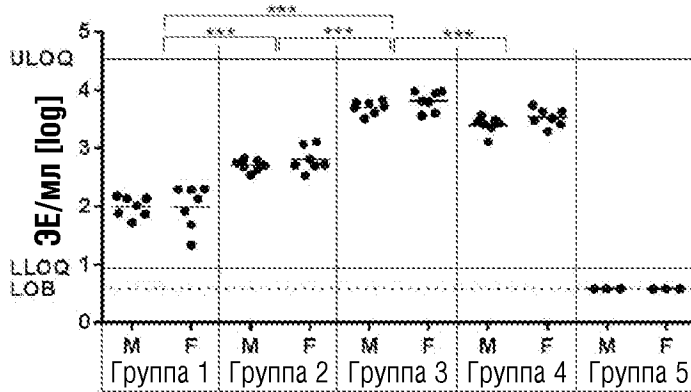


**IGR 44/45**

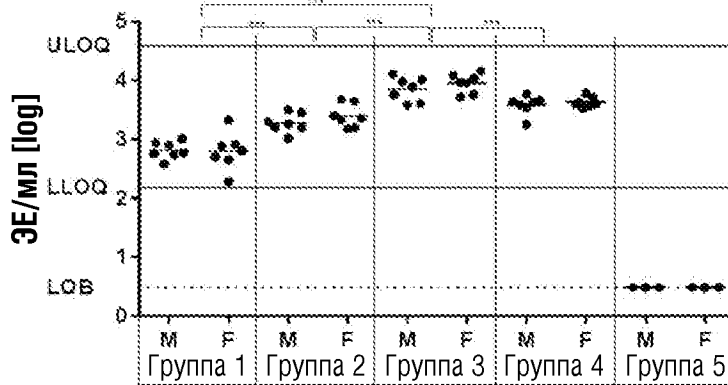


**IGR 88/89**

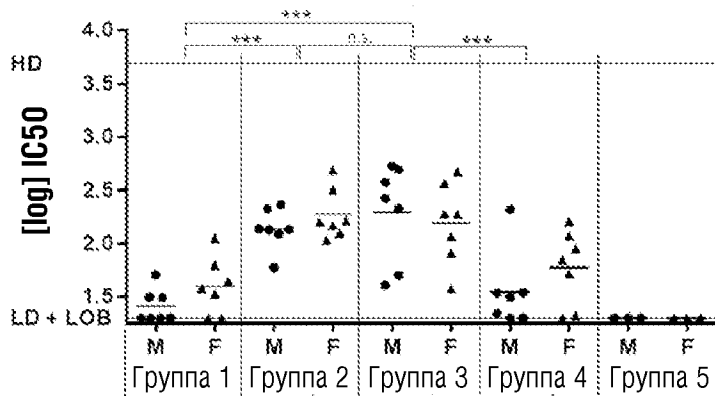
**ФИГ.9А** ELISA на gr140 кладотипа С  
на 85-й день (неделю 12)



**ФИГ.9В** ELISA на мозаичный gr140  
на 85-й день (неделю 12)



**ФИГ.9С** VaL VNA (Класс 1В, кладотип В)  
на 85-й день (неделю 12)



Группа 1: Первичная доза: Ad26

Бустер-доза: Ad26

Группа 2: Первичная доза: Ad26

Бустер-доза: MVA

Группа 3: Первичная доза: Ad26

Бустер-доза: MVA+GP140

Группа 4: Первичная доза: Ad26.

низкая доза

Бустер-доза: MVA+GP140,

низкая доза

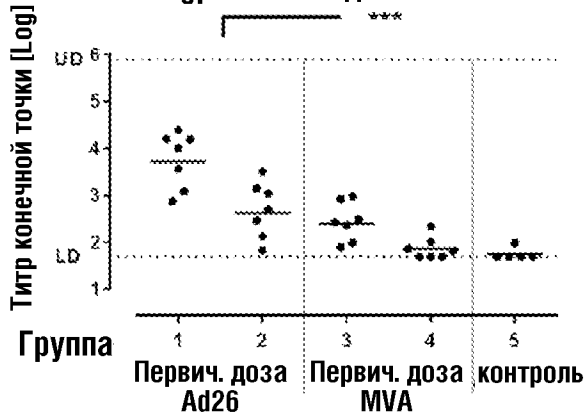
Группа 5: Первичная доза: Ad26.Empty

Бустер-доза: BN-MVA.Empty



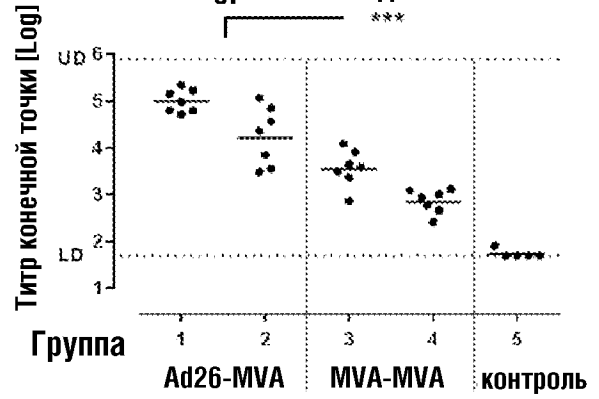
**ФИГ.10А**

ELISA на мозаичный  
gp140 на неделю 5



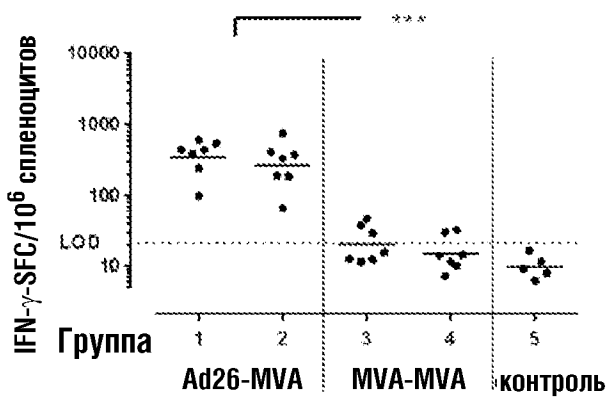
**ФИГ.10В**

ELISA на мозаичный  
gp140 на неделю 7



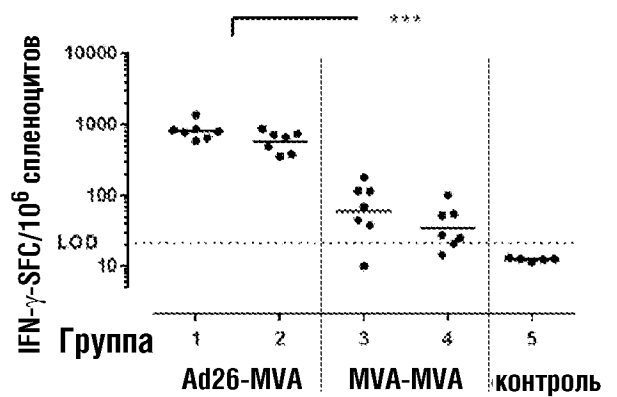
**ФИГ.10С**

ELISPOT на IFN- $\gamma$  Env,  
на неделю 7



**ФИГ.10D**

ELISPOT на IFN- $\gamma$  Gag,  
на неделю 7



**ФИГ.10Е**

ELISPOT на IFN- $\gamma$  Pol,  
на неделю 7

